GUSTAVO YUZO UJIKAWA

Estudo da susceptibilidade de camundongos bons ou maus respondedores para inflamação aguda a neurotoxinas empregadas em modelos de Parkinson

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2011

Gustavo Yuzo Ujikawa

Estudo da susceptibilidade de camundongos bons ou maus respondedores para inflamação aguda a neurotoxinas empregadas em modelos de Parkinson

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Lanfranco Ranieri Paolo Troncone

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ujikawa, Gustavo Yuzo.
Estudo da susceptibilidade de camundongos bons ou maus respondedores para inflamação aguda a neurotoxinas empregadas em modelos de Parkinson / Gustavo Yuzo Ujikawa. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Lanfranco Ranieri Paolo Troncone.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Farmacologia.

Versão do título para o inglês: Susceptibility of mice genetically selected for acute inflammatory reactions to neurotoxins used in Parkinson´s disease models.

Descritores: 1. Doença de Parkinson 2. Camundongo 3. Neuroinflamação 4. MPTP 5. Rotenona I. Troncone, Lanfranco Ranieri Paolo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0166/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Gustavo Yuzo Ujikawa.

Título da Dissertação: Estudo da susceptibilidade de camundongos bons ou maus respondedores para inflamação aguda a neurotoxinas empregadas em modelos de Parkinson.

Orientador(a): Lanfranco Ranieri Paolo Troncone.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Presidente: Nome completo: .....
Instituição: .....

INSTITUTO BUTANTAN

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Parkinson experimental: conseqüências na neurotransmissão estriatal, glicina e inflamação" **protocolo nº 397/07,** sob a responsabilidade de Lanfranco Ranieri Paolo Troncone, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/09/2007.

We certify that the research entitled "Parkinson's disease: effects on strital neurotransmitter release, role of glycine and inflammation", **protocol n° 397/07,** under the responsibility of Lanfranco Ranieri Paolo Troncone, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 09/12/2007.

A CEUAIB autorizou as mudanças solicitadas pelo pesquisador, ou seja, aditivo para espécie camundongos.

Vigência do Projeto: 06/2007 – 12/2011	**N° de animais/espécie**	**ADITIVO**
Laboratório de Farmacologia	408 camundongos AIRmax; AIRmin; LIII; HIII 200 camundongos Balb/c	120 camundongos C57Bl/6

São Paulo, 19 de abril de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

Dedico este trabalho á minha querida família:
Toshiyuki Ujikawa,
Emiko Ariki Ujikawa e
Maria Claudia Yuri Ujikawa,
Sem estes a vida não seria linda, simples,
digna e deliciosa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Lanfranco Ranieri Paolo Troncone, por todos estes anos de comprometimento, dedicação e por encaminhar todo conhecimento necessário para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Orlando Garcia Ribeiro do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, por sugerir idéias ao trabalho e ceder as linhagens AIRmax e AIRmin.

Á Dra. Kátia Ramos Moreira Leite e aos técnicos do Laboratório de Patologia do Hospital Sírio Libanês, Isaque, Fernando, Felipe, Joseane e Dora por colaborarem com a imunohistoquímica.

Aos Drs. Carlos Jared e Marta Maria Antoniazzi do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, por disponibilizarem o laboratório para histologia.

A Rosana Duarte Prisco da Comissão de Planejamento Estratégico do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, que com imensa gentileza e dedicação, me ajudou na análise estatística dos dados.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, que por todos estes anos estiveram presentes se dedicando as suas funções e contribuindo na realização deste trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro que tornou viável o desenvolvimento desta dissertação (processo: 2008/55895-4).

Aos meus amigos, Leandro, Carlos, Wilson, Milene, Katherine, Cintia, Andréa, Camila, Thandara, Rafaela, Luciana, Adriana e Karyn, pelo companheirismo, convivência, risadas, incentivos, favores, festas e por tornarem os dias no laboratório mais prazerosos, divertidos e alegres.

E principalmente a Deus por ter me dado a vida e a Fé.

Muito obrigado a todos !!

“Quantas estradas precisará um homem andar

Antes que possam chamá-lo de um homem?

Quantos mares precisará uma pomba branca sobrevoar

Antes que ela possa dormir na areia?

Sim e quantas vezes precisará balas de canhão voar

Até serem para sempre banidas?

A resposta, meu amigo, está soprada no vento

A resposta está soprada no vento ...” (Bob Dylan)

RESUMO

Ujikawa GY. Estudo da susceptibilidade de camundongos bons ou maus respondedores para inflamação aguda a neurotoxinas empregadas em modelos de Parkinson. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Estudos laboratoriais, epidemiológicos e terapêuticos em humanos e animais apontam os processos neuroinflamatórios como um dos possíveis agravantes do mal de Parkinson. A intervenção sobre a inflamação vem sendo objeto de estudo para retardar ou impedir a progressão deste mal. Linhagens de animais propensos a produzirem respostas inflamatórias intensas ou fracas podem ser usadas para questionar o envolvimento dos processos inflamatórios em diversas patologias. Neste estudo investigamos a susceptibilidade de duas linhagens de camundongos não isogênicos selecionados quanto a suas capacidades de produzir alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) resposta inflamatória aguda aos agentes neurotóxicos 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropirimidina (MPTP) e rotenona. Grupos destes animais machos jovens (3 meses) e adultos (6 meses), tendo como controles camundongos BALB/c e C57BL/6, foram empregados nos modelos animais de Parkinson induzidos por MPTP (4 x 20 mg/kg ou 5 x 20mg/kg s.c. a cada 2 horas em um único dia) e rotenona (tratamento crônico: infusão s.c. contínua por bomba osmótica Alzet a 3, 6 e 12 mg/kg/dia por 28 dias ou sub-crônico: injeção i.p. na dose de 3 mg/kg/dia durante 10 dias). Os animais foram submetidos à avaliação motora por Rotarod empregando paradigma de 5 minutos e rotação crescente de 5 a 50 rpm medindo-se o tempo de permanência no aparelho. A lesão foi quantificada por imunohistoquímica para tirosina hidroxilase em cortes de estriado e substância negra. Os resultados sugerem que ambas as linhagens de camundongos AIRmax e AIRmin, são resistentes a lesão neuronal por MPTP ou rotenona. Conjecturamos que as linhagens se diferenciam quanto a resposta inflamatória periférica, mas não de origem central (neuroinflamação).

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Neuroinflamação. Camudongo. MPTP. Rotenona.

ABSTRACT

Ujikawa GY. Susceptibility of mice genetically selected for acute inflammatory reactions to neurotoxins used in Parkinson´s disease models. Masters thesis (Biotechnology). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Laboratory, epidemiological and therapeutic studies in humans and animals, suggest that neuroinflammatory processes are involved in Parkinson's disease. The intervention on inflammation has been the object of study to prevent or delay the progression of this disease. Strains of animals capable to produce strong or weak inflammatory responses can be used to challenge the involvement of inflammatory processes in several pathologies. We investigated the susceptibility of two inbred strains of mice selected for their ability to produce high (AIRmax) or low (AIRmin) acute inflammatory to neurotoxins 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP) and rotenone . Groups of young males (3 months) and adults (6 months) having BALB/c and C57BL/6 as control, were used in animal models of Parkinson's disease induced by treatment with MPTP (4 x 20 mg/kg or 5 x 20mg/kg s.c. every 2 hours in a single day) and rotenone (chronic treatment: continuous s.c. infusion of 3, 6 and 12 mg/kg/day by Alzet osmotic pump for 28 days or sub-chronic treatment: i.p. injection at a dose of 3 mg/kg/day for 10 days). The animals were evaluated by rotarod apparatus in sessions of 5 minutes and constantly increasing speed from 5 to 50 rpm, measuring the time spent on the rotating bar. The lesion was quantified by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry in sections of striatum and substantia nigra. The results suggest that both strains of mice AIRmax and AIRmin are resistant to neuronal damage by MPTP or rotenone. We conjecture that the strains differ concerning the peripheral inflammatory response, but not in neuroinflammatory mechanisms.

Key words: Parkinson´s disease. Neuroinflammation. Mice. MPTP. Rotenone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da organização funcional dos núcleos da base de acordo com o modelo hipotético proposto por Atisushi Nambu 17

Figura 2: Representação esquemática comparando as mudanças ocorridas na organização funcional dos núcleos da base na doença de Parkinson 19

Figura 3: Representação esquemática do funcionamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial 23

Figura 4: Intercruzamento das oito linhagens isogênicas que deram origem à população inicial (F_0), que gerou as linhagens AIRmax e AIRmin por seleção bidirecional.....33

Figura 5: Ilustração representativa de uma mini-bomba osmótica Alzet 36

Figura 6: Ilustrações representativas do aparato de avaliação motora, Rotarod Ugo Basile 37

Gráfico 1: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 4 à 40rpm durante 5 minutos, empregando camundongos jovens (3 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após o tratamento de 4 x 20 mg/kg do MPTP 40

Gráfico 2: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 4 à 40 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos jovens (3 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após o tratamento de 5 x 20 mg/kg do MPTP 41

Gráfico 3: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 5 à 50 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos adultos (6 meses) das linhagens AIRmax e AIRmin antes e após o tratamento de 5 x 20 mg/kg do MPTP 43

Gráfico 4: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 5 à 50 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos adultos (6 meses) das linhagens BALB/c, C57BL/6, AIRmax e AIRmin antes e após o tratamento de 4 x 20 mg/kg do MPTP 44

Gráfico 5: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 4 à 40 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos jovens (3 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após tratamento com a Rotenona (3 mg/kg/dia) 47

Gráfico 6: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 5 à 50 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos adultos (6 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após tratamento com a Rotenona (6 mg/kg/dia) 48

Figura 7: Imunohistoquímica contra tirosina hidroxilase da região da substância negra. AIRmin Controle.....50

Figura 8: Imunohistoquímica contra tirosina hidroxilase da região da substância negra. AIRmin tratado com rotenona 6 mg/kg/dia.....50

Gráfico 7: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 5 à 50 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos adultos (6 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após tratamento com a Rotenona (12 mg/kg/dia) 51

Gráfico 8: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 5 à 50 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos adultos (6 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após tratamento com a Rotenona (3 mg/kg/dia) 52

Gráfico 9: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 5 à 50 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos adultos (6 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após tratamento com a Rotenona (3 mg/kg/dia i.p.) 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
AIR	Responsividade Inflamatória Aguda
ATP	Adenosina trifosfato
CCL2	Ligante 2 de quimiocinas
CL	Corpúsculo de Lewy
COX-2	Ciclooxigenase-2
Cyt c	Citocromo c
D1	Receptor dopaminérgico D2
D2	Receptor dopaminérgico D1
DA	Dopamina
DAMPs	Padrões moleculares associados a tecidos danificados
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson ou mal de Parkinson
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Glu	Ácido glutâmico
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
GSH	Glutationa ou γ-glutamilcisteinilglicina
GSSG	Glutationa oxidável
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
INF	Interferon
iNOS	Oxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
JNK	Quinase N-terminal Jun
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilanina
MAO	Monoamina oxidase
MAO-B	Monoamina oxidase-B
MCP1	Proteína quimiotática de monócitos -1
MPP+	1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NAPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo - P
NB	Núcleos da base
NF-κB	Fator nuclear kB
NL	Neuritos de Lewy
NST	Núcleo subtalâmico
ON	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PEG	Polietileno glicol
PGE	Prostaglândina E
PGE2	Prostaglândina E2
PRR	Receptores para reconhecimento padrão moleculares
Q	Ubiquinona
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s.c.	Subcutâneo
SNC	Sistema nervoso central
SNc	Substância negra compacta
SNr	Substância negra reticulada
ST	Estriado
TGF	Fator de crescimento tumoral
TH	Tirosina hidroxilase
TLR	Receptor *toll-like*
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor de fator necrose tumoral tipo 1
Tp	Média do tempo de persistência
TT	Tempo de tratamento
TVMA2	Transportador vesicular de monoamina
UCH-L1	Enzima hidrolase C-terminal da ubiqüitina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 O circuito neuronal e alterações na DP 16
1.2 Aspectos morfológicos e fisiológicos da DP 19
1.3 Agentes neurotóxicos e modelos animais para DP 25
1.4 Aspectos inflamatórios 27
1.5 As linhagens AIRmax e AIRmin 32
2 OBJETIVO 34
3 MATERIAIS E MÉTODOS 35
3.1 Animais 35
3.2 MPTP 35
3.3 Rotenona 35
3.4 Avaliação comportamental (Rotarod) 36
3.5 Quantificação da lesão neuronal 37
3.6 Análise estatística 39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
4.1 MPTP 40
4.2 Rotenona 46
4.3 Linhagens AIRmax e AIRmin 56
5 CONCLUSÕES 58
REFERÊNCIAS 59

1 INTRODUÇÃO

O mal de Parkinson ou doença de Parkinson (DP) foi inicialmente descrito por James Parkinson em 1817, sua descrição foi fundamental para o conhecimento da doença e o espectro clínico evoluiu muito desde então. Em 1912 Friedrich Heinrich Lewy descreveu corpúsculos de inclusão no citoplasma de neurônios dopaminérgicos nigrais, que são vistos como característica patognomônica da DP idiopática. Mais de cem anos após a descoberta, se determinou que a DP estava relacionada à perda de neurônios na substância negra em sua porção compacta (1). Foi somente em 1957 com a descoberta da dopamina por Arvid Carlsson que a compreensão desta doença ganhou maior significado. Com a descrição do sistema nigro-estriatal de transmissão dopaminérgica, chegou-se ao emprego do precursor natural da dopamina, a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) como tratamento paliativo para esta doença devastadora, com grandes melhoras no quadro motor. No entanto, o uso crônico da L-DOPA leva ao desenvolvimento gradual de movimentos descoordenados involuntários chamados de discinesias.

A DP é uma doença neurodegenerativa que é caracterizada por uma perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra compacta. Ela afeta 1,5% da população mundial acima dos 65 anos (2), sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum relacionada à idade, atrás somente do mal de Alzheimer. A ocorrência de casos chamados esporádicos ou idiopáticos, por não terem aparentemente etiologia genético-hereditária, constitui a grande maioria dos casos. Cerca de 10% dos casos têm natureza hereditária (3, 4). A causa do inicio e progressão da DP nos casos idiopáticos, estão associados a predisposições multifatoriais e genéticas, neuroinflamação, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, distúrbios na cadeia de degradação de proteínas, neurotoxinas ambientais e envelhecimento (5-8). Os principais sintomas motores envolvem graus diferentes de tremor no repouso, rigidez muscular, dificuldades em iniciar movimentos ou lentidão dos movimentos voluntários (bradicinesia) ou mesmo falta de movimentos (acinesia), alterações da marcha com quedas freqüentes. Outros sintomas não motores associados à DP envolvem falta de expressão facial, lentidão dos pensamentos, desconexão com o ambiente (ausência), falta de iniciativa,

depressão, demência, perda olfatória (anosmia), disfunção sexual, hipotensão, anormalidades no sono, distúrbios gastrointestinais e disfunção autonômica (9-11).

1.1 O circuito neuronal e alterações na DP

A descrição do circuito neuronal extrapiramidal relacionado à execução correta dos movimentos voluntários é extensa, e várias revisões já foram publicadas trazendo em detalhes as estruturas e vias envolvidas. Cabe a tarefa à complexa rede neural que inclui o córtex cerebral, o tálamo e os núcleos da base (NB). Os NB estão interpostos entre o córtex e o tálamo, e constituem-se de quatro núcleos subcorticais interconectados: o estriado (ST), que é constituído por núcleo caudado, *putâmen* e *accumbens*; o globo pálido formado por dois segmentos, o globo pálido externo (GPe) e o interno (GPi); a substância negra, constituída por substância negra compacta (SNc) e substância negra reticulada (SNr); e o núcleo subtalâmico (NST). Os NB são encarregados de processar os sinais provenientes do córtex, para produzir um sinal de saída que retorna ao córtex através do tálamo, modulando a execução do programa motor desejado (12).

Muitos autores atribuem um papel central ao NST, para onde convergem vias dopaminérgicas provenientes da SNc, gabaérgicas provenientes do GPe e glutamatérgicas provenientes do córtex, esta que constitui a maior projeção excitatória para esta estrutura, formando a chamada **via hiperdireta** ou **via cortico-NST-GPi/SNr**, pelo fato do NST projetar-se ao GPi e SNr. O NST também projeta outras vias glutamatérgicas para a SNc e GPe. Outra importante eferência excitatória ocorre do córtex ao ST que também recebe a importante aferência dopaminérgica da SNc, cuja lesão leva primariamente ao parkinsonismo. O ST emite projeções gabaérgicas diretamente para o GPi e SNr, constituindo a chamada **via direta** ou **via cortico-ST-GPi/SNr**. Por meio de uma outra via, o ST emite projeções gabaérgicas ao GPe que por sua vez, emite projeções gabaérgicas ao GPi e SNr , a chamada **via indireta** ou **via Cortico-ST-GPe-NST-GPi/SNr**. Os GPi e SNr são os principais núcleos de saída dos NB, que emitem projeções gabaérgicas ao tálamo de onde saem vias glutamatérgicas que retornam ao córtex (Figura 1).

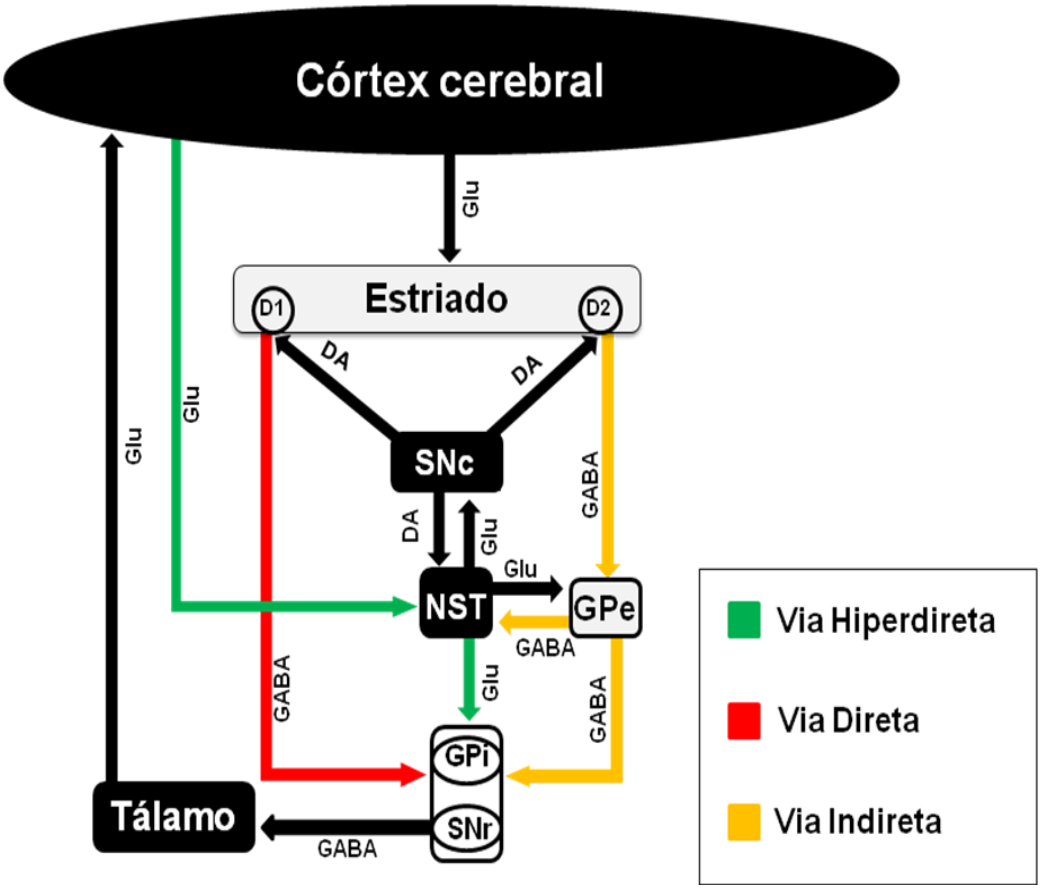

Figura 1: Representação esquemática da organização funcional dos núcleos da base de acordo com o modelo hipotético proposto por Atisushi Nambu. **SNc**: substância negra compacta; **SNr**: substância negra reticulada ; **NST**: núcleo subtalâmico; **GPe**: Globo pálido externo; **GPi**: globo pálido interno;**D1**: receptor dopaminérgico D1; **D2**:Receptor dopaminérgico D2; **Glu**: ácido glutâmico; **GABA**: ácido gama-aminobutírico; **DA**: Dopamina.
Fonte: Modificado de Nambu, 2005 (13).

(Nambu, 2005) hipotetizou (13) o que seria o “modelo dinâmico” da função dos NB no controle do movimento voluntário (Figura 1). Segundo o modelo quando um movimento voluntário é iniciado por mecanismos corticais, o sinal é rapidamente transmitido do córtex motor ao GPi/SNr, através da via hiperdireta, excitando em grandes proporções o GPi/SNr, suprimindo uma vasta área do tálamo e córtex motor envolvidas tanto no programa motor selecionado, quanto nos programas que estão competindo. Ao mesmo tempo, mas com um pequeno atraso, outro sinal é conduzido pela via direta ao GPi/SNr, inibindo uma pequena população de neurônios palidais, resultando na desinibição somente dos programas motores selecionados no tálamo e córtex motor, permitindo assim o movimento desejado. Por fim e mais tardiamente, é ativada a via indireta que desinibe o GPi, resultando na inibição dos programas motores selecionados.

As duas vias de saída do ST são moduladas diferentemente pela projeção dopaminérgica exercida pela SNc. Neurônios estriatas que se projetam para a via direta apresentam alta densidade de receptores do tipo D1 excitatórios, que facilitam a transmissão e promovem a inibição do GPi e SNr, reduzindo o efeito inibitório desses núcleos sobre o tálamo, facilitando o movimento. Em contrapartida, os neurônios que se projetam para a via indireta apresentam receptores do tipo D2 inibitórios que reduzem a transmissão e modulam os sinais de saída inibitórios do ST nesta via, inibindo nas devidas proporções o GPe, desinibindo o NST, excitando os GPI e SNr, levando à inibição do tálamo e suprimindo o movimento (14). Com a morte dos neurônios dopaminérgicos nigrais, esta via modulatória é perdida, acarretando em uma hiperatividade estimulatória do NST sobre o GPi/SNr, por aumentar a inibição gabaérgica do GPe pelo ST, na ausência da intervenção dos receptores D2, aumentando a inibição gabaérgica do GPi/SNr sobre o tálamo que por sua vez reduz a ativação cortical. Além disso, há uma redução na inibição gabaérgica do GPi/SNr exercida pelo ST na via direta (Figura 2). A depleção dopaminérgica estriatal no parkinsonismo causa a dessincronização funcional dos NB, resultando em disfunção motora (15).

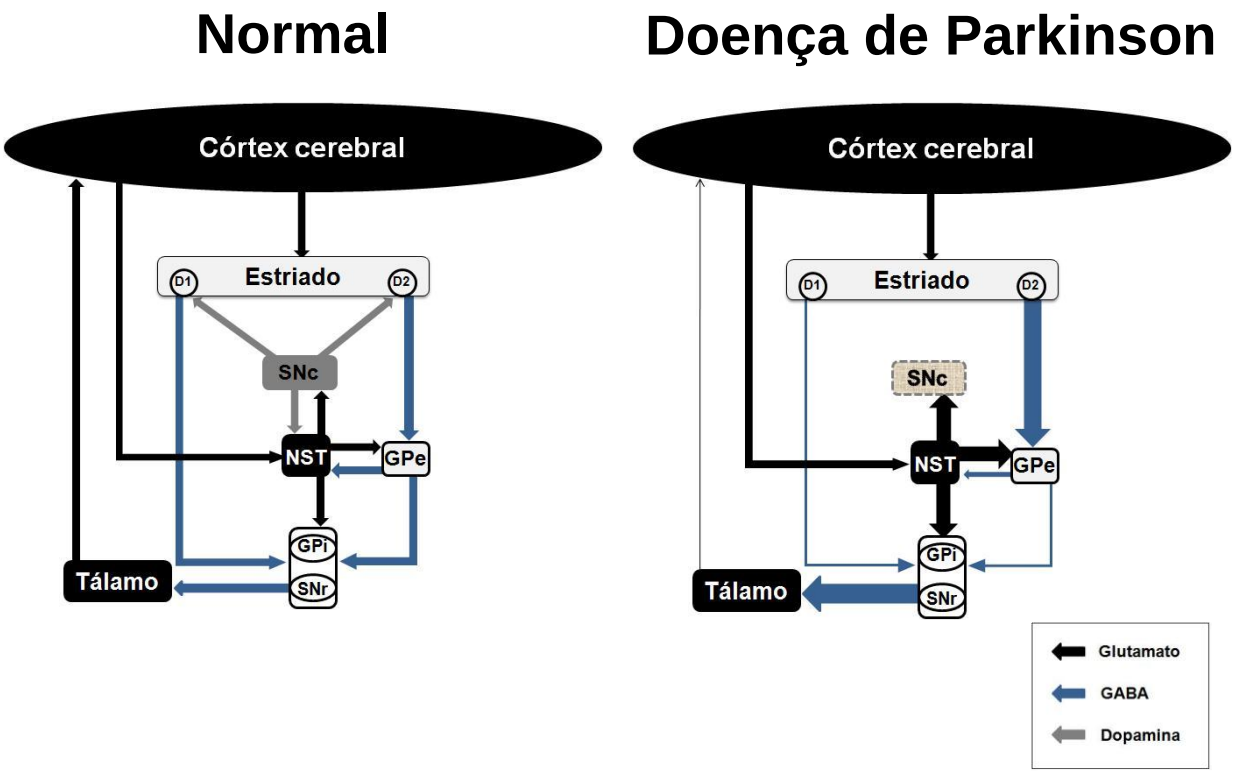

Figura 2: Representação esquemática comparando as mudanças ocorridas na organização funcional dos núcleos da base na doença de Parkinson. **SNc**: substância negra compacta; **SNr**: substância negra reticulada ; **NST**: núcleo subtalâmico; **GPe**: Globo pálido externo; **GPi**: globo pálido interno;**D1**: receptor dopaminérgico D1; **D2**:Receptor dopaminérgico D2;
Fonte: Modificado de Blandini et al., 2000 (12).

1.2 Aspectos morfológicos e fisiológicos da DP

A principal alteração morfológica observada em pacientes que sofrem da DP é a perda dos neurônios dopaminérgicos da SNc. Os sintomas motores só aparecem quando as perdas neuronais alcançam mais de 70% (16). Os neurônios dopaminérgicos nigrais são impregnados por neuro-melanina que lhes atribui uma coloração escura e, com a morte destes, ocorre uma despigmentação desta estrutura. Ocorre também a formação de agregados protéicos citoplasmáticos constituídos principalmente pelas proteínas α-sinucleina, parkina, ubiquitina e a enzima hidrolase C-terminal da ubiqüitina (UCH-L1), que foram chamados de corpúsculos de Lewy (CL) e neuritos de Lewy (NL). Estes agregados não são um achado exclusivo dos casos de mal de Parkinson, mas são importantes no

diagnóstico da doença (17). (Baak et al., 2003) (18) propuseram um esquema de classificação da progressão da DP, relacionando a disposição dos CL e NL, com os sintomas e gravidade dos sinais clínicos da doença. No estágio I e II há o envolvimento dos agregados protéicos em regiões relacionadas ao olfato e tronco cerebral inferior, estágios III e IV os agregados se estendem ao mesencéfalo (principalmente à SNc), prosencéfalo, córtex transentorrinal e região CA2 do hipocampo, e nos estágios V e VI envolvem áreas corticais temporais e insulares, córtex cingulado anterior e neocórtex. Os distúrbios olfatórios, autonômicos e anormalidades no sono são os sintomas precoces da DP, precedidos por problemas motores e cognitivos em estágios mais avançados da doença (19).

As principais proteínas que estão envolvidas na formação dos CL ou NL parecem estar envolvidas também nos raros casos de parkinsonismo hereditário (4). As proteínas ubiquitina, parkina e a enzima UCH-L1 pertencem à cadeia de degradação protéica da ubiquitina-proteassomo. Esta cadeia é responsável pela eliminação de proteínas em desuso ou mal-conformadas que precisam ser eliminadas para não interferirem com os processos fisiológicos normais da célula. Disfunção no sistema ubiquitina-proteassomo está relacionada à DP e pode contribuir para neurodegeneração (20). A parkina pertence a uma classe de enzimas chamadas de ubiquitina-ligases que estão encarregadas em marcar com ubiquitina as proteínas defeituosas que deverão ser reconhecidas pelo complexo de degradação do proteassomo para serem destruídas (21). A UCH-L1 é uma enzima responsável pela reciclagem das ubiquitinas (22). Mutações nestas proteínas em diferentes posições e condições foram detectadas em casos de Parkinson hereditário e foram objetos de uma revisão recente (23).

A proteína α-sinucleína é o componente mais abundante nos CL e NL. O seu papel biológico é fortemente relacionado com a biossíntese, regulação e manutenção da homeostase dopaminérgica citoplasmática (24). (Perez et al., 2002) (25) demonstraram a interação da α-sinucleína com a enzima tirosina-hidroxilase (TH), sugerindo um papel de regulador negativo da síntese de dopamina ao interagir com TH e reduzir a atividade da enzima. Por outro lado outros estudos apontam a α-sinucleína como um regulador da dinâmica de estocagem de vesículas pré-sinápticas. Camundongos desprovidos de α-sinucleína, após pulsos pareados ao

nervo pré-sináptico dopaminérgico, apresentam excessiva liberação de neurotransmissores, acompanhado por depleção do estoque de vesículas distais ancoradas com lenta reposição (26). (Wersinger et al., 2003) (27) por meio de estudos de imunoprecipitação demonstraram a formação de um complexo estável entre a α-sinucleína e o transportador de dopamina, propondo uma modulação negativa exercida pela α-sinucleína na recaptação de dopamina pelo transportador. Estudos (28,29) constataram que agregados protofibrilares e precipitados de α-sinucleína, causam a formação de poros em membranas, incluindo membranas vesiculares dopaminérgicas, gerando vazamento de neurotransmissor e aumento nos níveis de dopamina livre citoplasmático, este que é fortemente suscetível a auto-oxidação podendo gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), como dopamina-quinonas e ânions superóxidos (30).

Muitas reações intracelulares utilizam moléculas de oxigênio para catálise e produção de adenosina trifosfato (ATP). Essas reações por sua vez acabam gerando ROS tais como ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila, e na presença de óxido nítrico (ON) produzem espécies reativas de nitrogênio (RNS) tais como peroxinitrito e radicais nitro-tirosila (31). Estas espécies reativas são fundamentais para a correta execução dos processos fisiológicos, mas a produção em excesso pode levar a célula ao estresse oxidativo, produzindo efeitos tóxicos diretamente, através da oxidação de ácidos nucléicos, peroxidação de lipídios e nitração de proteínas, ou indiretamente por interferir em complexos da cadeia respiratória mitocondrial (32, 33) ou promover oligomerização da α-sinucleína formando agregados protéicos (34, 35) que podem sequestrar proteínas vitais à célula (4) principalmente as envolvidas na via de degradação de proteínas ubiquitina-proteossomo (35).

Os neurônios dopaminérgicos particularmente apresentam maior carga oxidativa que os demais neurônios e são mais susceptíveis ao estresse oxidativo por conta da metabolização da dopamina. A síntese da dopamina no terminal nervoso ocorre através da hidroxilação da tirosina pela enzima TH formando L-DOPA, esta que é descarboxilada pela enzima descarboxilase de ácidos aromáticos originando a dopamina (36). Uma vez formada a dopamina é sequestrada do citosol pelo transportador vesicular de monoamina (TVMA2) e é armazenada em vesículas (37).

Quando liberadas na fenda sináptica, a dopamina extracelular é recaptada pelo transportador de dopamina, onde é reestocada em vesículas pelo TVMA2, ou é degradada pela enzima monoamina oxigenase B (MAOB) produzindo 3,4-dihidroxifenilaldeido que é rapidamente oxidado pela enzima aldeído desidrogenase para ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e peróxido de hidrogênio (38). O DOPAC pode sofrer oxidação no citosol originando DOPAC-quinona e ROS (39) e o peróxido de hidrogênio pode ser convertido em radicais hidroxila altamente tóxicos e reativos quando reagem com átomos de ferro reduzidos, que são encontrados em altos níveis na SNc (40, 41). Foi observada interação entre a neuro-melanina e metais intracelulares, contribuindo para a produção de ROS e danos aos neurônios dopaminérgicos (42). Como já citado, a dopamina também é capaz de sofrer auto-oxidação em pH normal intracelular na presença de moléculas de oxigênio, quinonas reativas, radicais superóxidos livres e peróxido de hidrogênio (43), a estocagem em vesículas com pH ácido impede a auto-oxidação (44).

As mitocôndrias são organelas que estão envolvidas na regulação de vias de apoptose celular, homeostase do cálcio e principalmente produção de energia intracelular através da fosforilação oxidativa (45-47). Tal processo ocorre nas cristas mitocondriais, onde as enzimas e outros componentes envolvidos na cadeia transportadora de elétrons se encontram. Resumidamente, a cadeia transportadora de elétrons é composta por cinco complexos (I,II,III,IV e ATP-sintase) encarregados em gerar energia na forma de ATP através da passagem de elétrons entre os complexos. Esta leva a uma movimentação de prótons de hidrogênio da matriz para o espaço inter-membranoso da mitocôndria, gerando um gradiente eletroquímico de prótons usado pela enzima ATP-sintase na síntese de ATP (47) (Figura 3).

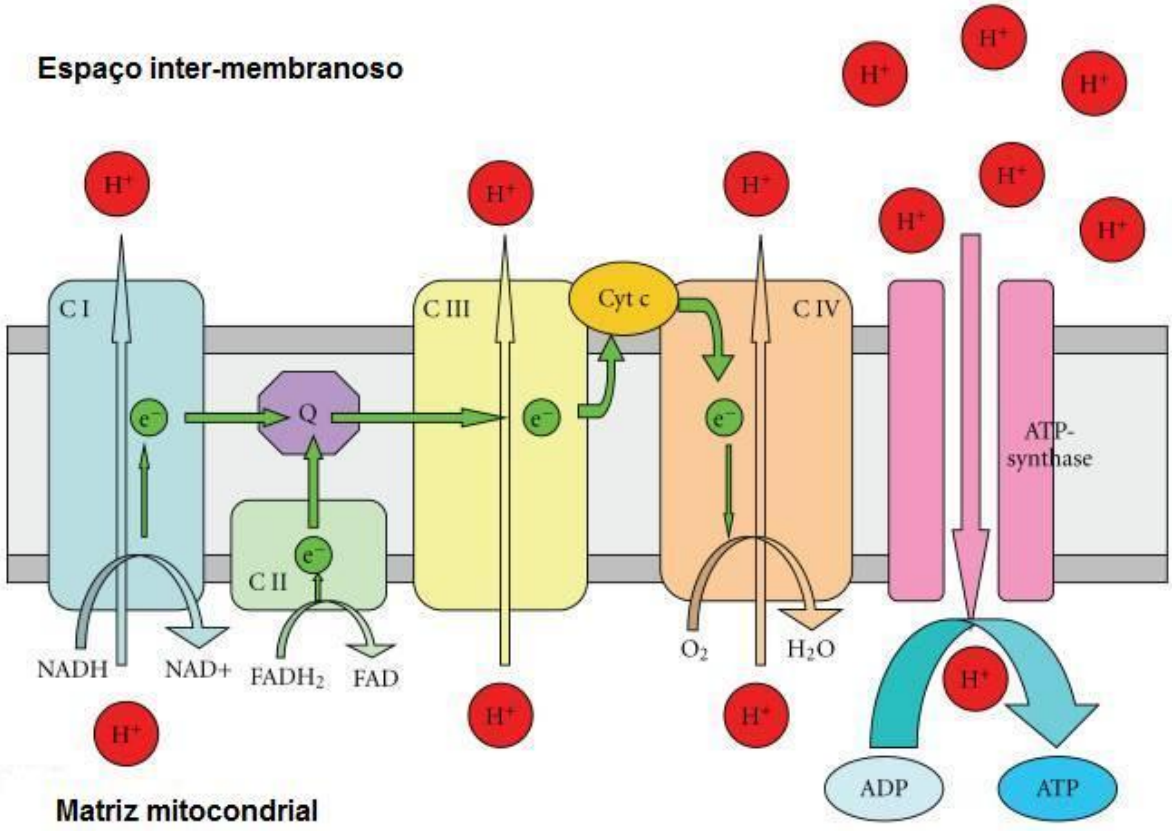

Figura 3: Representação esquemática do funcionamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. CI, II, III e IV (Complexos I, II, III, IV). Q (ubiquinona). Cyt c (citocromo c). Observa-se o transporte de elétrons gerado pela conversão do NADH para NAD+ (CI) ou $FADH_2$ para FAD (CII) que passa pela ubiquitinona, CIII, Cys c e bomba de próton (CIV). A diferença no gradiente eletroquímico conduz a formação de ATP a partir do ADP pela ATP-sintase.
Fonte: Keane et al., 2010 (47).

Embora o transporte de elétrons na mitocôndria seja um processo extremamente eficiente (48), em condições normais, estocasticamente pode ocorrer o vazamento de elétrons da cadeia, especificamente nos complexos I (49, 50) e III (51, 52), que podem reagir com oxigênio e geram ROS, que são removidos pelas enzimas antioxidantes, manganês superóxido dismutase e glutationa (GSH) (47). Alguns agentes neurotóxicos como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), 6-OH-Dopamina (6-OHDA) e a rotenona induzem sintomas semelhantes à DP, agem inibindo estes complexos (53 , 54). (Lang et al., 1998) (55) constataram uma redução de 30 a 40 % da atividade do complexo I na SNc em pacientes parkinsonianos, evidenciando a importância da disfunção mitocondrial na gênese da DP. O aumento nos níveis de ROS na mitocôndria pode levar a danos oxidativos, acarretando em déficit energético, progressiva disfunção de sistemas fisiológicos

dependentes de ATP e ativação de vias dependentes de caspases, resultando em apoptose celular (56, 57). A ativação de vias de apoptose celular mitocôndria-dependentes são encontradas no cérebro de pacientes parkinsonianos *post-mortem* e em modelo animais com roedores. Tais vias envolvem a permeabilização da membrana externa mitocondrial, levando a liberação do citocromo c, fatores indutores de apoptose, endonuclease G e ativadores de caspases. Maiores detalhes em: (58,59).

A GSH é o principal agente antioxidante intracelular e protetor contra ROS, RNS e peróxidos. Sua função é manter o equilíbrio oxidação-redução da célula. Os GSH removem espécies reativas via redução não enzimática, enquanto que a remoção de hidroxiperóxido requer a intervenção enzimática da glutationa peroxidase. Ambas as reações levam a produção de glutationa oxidável (GSSG) que pode ser reduzida a GSH novamente pela enzima glutationa redutase, ou pode ser transportado para fora da célula, levando a depleção de GSH. Este esgotamento é atenuado pela síntese de GSH no próprio neurônio ou glia por mecanismos dependentes de ATP (60). O estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio oxidação-redução é alterado em favor de GSSG, que pode ser devido à diminuição da capacidade de redução da célula ou aumento no potencial de redução (61). Especificadamente neurônios dopaminérgicos, por apresentarem alta carga oxidativa, são menos tolerantes a pequenas variações nos níveis de GSH e ROS/RNS (35).

A inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons por meio de neurotoxinas leva a sintomas semelhantes à DP(62, 63), gerando ROS e RNS prosseguido por redução nos níveis de GSH (64). Foi observado na SNc de pacientes parkinsonianos, a redução de mais de 50% nos níveis de GSH, que pode causar disfunção do sistema de degradação de proteínas ubiquitina-proteossomo, com efeito direto sobre a enzima E1-ubiquitina ligase e proteassomo 26S, desabilitando suas funções, levando à redução da atividade do sistema, e ao acúmulo de proteínas danificadas, podendo gerar os CL e NL (35, 65, 66).

1.3 Agentes neurotóxicos e modelos animais para DP

Algumas substâncias com propriedades diversas parecem desenvolver a mesma lesão seletiva de neurônios dopaminérgicos da SNc, acompanhada de sintomas semelhantes ao parkinsonismo tanto em humanos quanto em animais e deram origem a modelos experimentais deste mal. Entre estas substâncias estão análogos da dopamina como a 6-OHDA, o MPTP, um contaminante da heroína sintética, pesticidas e herbicidas como a rotenona, paraquat e maneb.

A 6-OHDA foi o primeiro agente químico empregado em estudos da DP. Esta substância se acumula nas células dopaminérgicas e acaba por matá-las por algum mecanismo relacionado a estresse oxidativo (67). Após injeção intracranial local, esta neurotoxina é captada seletivamente pelas células dopaminérgicas e acredita-se que provoque a liberação de ROS, levando à formação de quinonas que reagem com grupamentos nucleofílicos. A lesão produzida pela 6-OHDA não gera CL, tipicamente encontrado em tecido nervoso de pacientes parkinsonianos (68). O paraquat é um herbicida de largo emprego e o maneb é um fungicida a base de manganês. Estes apresentam toxicidade considerável quando separados, mas administrados em conjunto potenciam seus efeitos lesivos sobre as células nigrais levando a um quadro semelhante à DP (69). Este modelo é bem menos estudado e compreendido.

O uso ilícito da heroína acarretou o surgimento de um grande número de usuários que desenvolveram sintomas parkinsonianos. Determinou-se que lotes de heroína estavam contaminados por MPTP, que provou ser uma valiosa ferramenta para o desenvolvimento de modelos animais para este mal (70). Atualmente este modelo tem sido o mais empregado e caracterizado em estudos da DP em camundongos. A administração aguda ou sub-crônica do MPTP é capaz de causar perda substancial de neurônios nigrais, mas não induz a formação de CL (71), mas ao contrário do que se achava a princípio, a administração crônica da droga induz (72). Observou-se a ativação da microglia na SNc de camundongos tratados pelo MPTP, havendo variação na ativação de acordo com o método de exposição à droga, positivo após a administração aguda e de difícil detecção após o tratamento sub-crônico (73). (Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999) (74) reportaram a presença de linfócitos T ativados, mas não de linfócitos B na SNc de camundongos com esse

modelo. Foi observado também que camundongos jovens e velhos se diferenciam quanto ao perfil de reatividade inflamatória ao tratamento agudo (75-77). Após administração sistêmica o MPTP, componente altamente lipofílico, ultrapassa a barreira hemato-encefálica e é captado pelas células gliais onde a enzima MAO-B o transformado no composto altamente tóxico 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP+), que é um excelente substrato para o transportador de dopamina. Ao entrar no neurônio, o MPP+ inibe o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, pois apresenta alta afinidade pelo complexo NADH:ubiquinona-oxidoredutase e interrompe o fluxo natural de elétrons do sistema, gerando déficit intracelular de ATP, ROS e RNS, que interferem e alteram diversos processos vitais celulares (4, 78, 79).

A rotenona é um isoflavonóide isolado da raiz de *Lonchocarpus* (*Leguminosae*) e tem sido usada pelos indígenas como pesticida com a vantagem de ser biodegradável. Por ser sensível à luz solar, tanto no solo quanto na água, apresenta um impacto menor ao meio ambiente, o que torna vantajoso o seu uso (31). A ingestão de rotenona não causa efeitos adversos em pessoas saudáveis, pois a sua digestão é lenta e incompleta e é eficientemente degradada pelo efeito de primeira passagem hepática. Mas quando ingerido em altas doses ou cronicamente excedendo a capacidade hepática de desintoxicação, pode gerar sintomas de parkinsonismo (80). A rotenona foi inicialmente empregada em 1985 em estudos da DP em ratos, quando foi administrada pela via intracranial (81). Embora o modelo tenha sido desenvolvido inicialmente para testar a “hipótese da mitocôndria” na DP, estudos subseqüentes, principalmente empregado o tratamento crônico pelas vias intravenosa ou subcutânea em ratos Lewis, sugerido por (Betarbet et al., 2000) (82), recapitularam outras características da doença, incluindo a formação de CL e NL, ativação precoce e sustentada da microglia, comprometimento nigral do sistema ubiquitina-proteossomo e acúmulo de ferro na SNc através de mecanismos envolvendo transferrina (83, 84), estes que contribuem para a neurodegeneração nigroestriatal. Disfunções em sistemas periféricos também foram descritos, como déficit da função gastrointestinal, doenças de retina, redução nos níveis de testosterona e distúrbios no sono, típicos da DP (85, 86). Assim o modelo animal da rotenona, entre os modelos de estudo para Parkinson com neurotoxinas, é o que mais reproduziu os sinais clínicos e patológicos da doença (85). Por ser muito lipofílica penetra rapidamente nas células e se acumula nas mitocôndrias,

bloqueando seletivamente o complexo I da cadeia de transporte de elétrons de modo semelhante ao MPTP, levando às mesmas conseqüências (82, 87).

1.4 Aspectos inflamatórios

Há diversas evidências apontando para o envolvimento da reação inflamatória no desenvolvimento do mal de Parkinson (88-90). A ativação de células gliais como a microglia chama a atenção em pacientes parkinsonianos (91) e em modelos animais para DP (92, 93). Descreveu-se o aumento de vários mediadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral-α (TNF-α), Interferon-γ (IFN-γ), Interleucinas (IL-6 e IL-1β), bem como na expressão de enzimas inflamatórias e oxidativas como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NAPH oxidase), ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na SNc de pacientes parkinsonianos (5, 94, 95).

A resposta imunológica inata representa uma rápida e estereotipada resposta para um número limitado de estímulos. É o primeiro mecanismo de defesa e reparo do organismo contra agentes infecciosos, traumas e danos teciduais. Este mecanismo conta com a remoção de substâncias estranhas por recrutamento de células imunológicas para o local da infecção, através da produção de citocinas e quimiocinas, fagócitose, ativação do sistema complemento e o processamento e apresentação de antígenos, para se necessário, ativar a resposta imunológica adaptativa (96). As principais células efetoras da imunidade inata são macrófagos e monócitos, células *natural killer*, dendrídicas e neutrófilos que estão envolvidas no reconhecimento e eliminação do patógeno e fragmentos celulares durante a infecção ou danos teciduais (97). Porém há poucas evidencias do envolvimento destas células periféricas na resposta imune no sistema nervoso central (SNC) (98). Atualmente sabe-se que as células residentes no SNC são capazes de produzir a sua própria resposta imunológica. Os oligodendrócitos, astrócitos e principalmente as microglias são as células que contribuem para a imunidade inata no SNC.

A resposta imunológica inata funciona através do reconhecimento não-específico de moléculas exógenas, chamadas de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), que podem ser moléculas derivadas de microorganismos como bactérias, vírus, protozoários e fungos (99), ou endógenas, chamadas de padrões

moleculares associados a tecidos danificados (DAMPs), que incluem proteínas danificadas como as fibrilas β-amilóides e agregados de α-sinucleina envolvidas em doenças neurodegenerativas (100, 101). Os PAMPs e DAMPs se ligam aos receptores para reconhecimento de padrão molecular (PRR), como os receptores dectina, *Nod-like* e os *toll-like* (TLR).

Os TLRs estão associados a doenças neurodegenerativas como a esclerose múltipla, mal de Alzheimer e DP (102). A grande maioria dos TLRs são receptores transmembrânicos que iniciam um sinal em resposta a PAMPs ou DAMPs, resultando na mudança conformacional do receptor, que induz por meio de complexas vias de sinalização intracelulares a ativação do fator de transcrição nuclear (NF-κB), levando a síntese de fatores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas, enzimas e outras moléculas essenciais para a eliminação do patógeno (98, 103), que podem contribuir aos danos neuronais em doenças neurodegenerativas (102). Estes receptores são expressos em macrófagos, neutrófilos e células dendrídicas (97, 104, 105) no sistema imune periférico. No cérebro são expressos nas microglias (106), astrocitos (107), oligodendrócitos (108) e neurônios (109). Pelo menos 13 tipos de TLRs foram identificados (110) e os seus respectivos ligantes com exceção do TLR10 em mamíferos (111): maiores informações em (105). Em humanos, demonstrou-se a expressão dos TLR2 e 3 em oligodendrócitos (108), TLR1-7, 9 e 10 em astrócitos, TLR1-9 na microglia (112) e TLR1-8 nos neurônios (113). Estudos em roedores demonstraram que a estimulação dos TLR4 e 3 em astrócitos, leva a produção de IL-6, TNF-α, INF-α e β (114). Já em microglia a ativação dos TLR4, TLR3 e TLR2 resulta na produção de IL-6, IL-10 e TNF-α (115, 116), IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α, INF-β, algumas quimiocinas e IL-6 e IL-10, respectivamente (112, 117). Estudos tem demonstrado aumento na expressão dos TLR2 e 5 na DP (118). O tratamento por MPTP demonstrou aumento na expressão do TLR4 na SNc em camundongos (119). Demonstrou-se que a chaperona HSP60 liberada de células nervosas mortas, pode atuar como ativador da microglia através dos TLR4 levando a neurodegeneração (103). O TLR4 também tem sido relacionado à alta produção de ROS levando ao estresse oxidativo, induzindo vias apoptóticas e neurodegeneração (120).

Os fatores imunológicos decorrentes de uma resposta inflamatória aguda de curta duração a uma infecção, trauma, acidente vascular cerebral, estresse oxidativos, podem contribuir para o edema cerebral, limitando o dano e promovendo a cura. Porém quando cronicamente sustentados em níveis elevados, podem levar a sérios prejuízos ao tecido, promovendo neurodegeneração (121). As microglias são células imuno-competentes residentes no SNC, principais atuantes na resposta imunológica inata, e exibem plasticidade funcional envolvendo morfogênese, proliferação e recrutamento celular, expressão de receptores de superfície e produção de fatores tróficos e pró-inflamatórios, são os macrófagos atuantes no SNC (122). Em condições fisiológicas estas são encontradas em grande número na SNc (123) e são extremamente sensíveis a alterações no microambiente extracelular a estímulos que variam de patógenos a agregados protéicos ou ainda, alterações na homeostase iônica (124). Estas também são responsáveis em manter a integridade tecidual local. O estado reativo da microglia varia de um estado de repouso para hiperativo sob controle de proteínas pró-inflamatórias reguladoras (125). Evidencias sugerem que as microglias podem executar um papel neuroprotetor na DP a curto prazo, no entanto com a progressão da doença fortes evidencias indicam que a microglia expresse moléculas de ativação e adesão na superfície celular e adote um estado mais hiperativo que é morfologicamente parecido aos macrófagos do sistema imunológico periférico (126). Neste estado as microglias são capazes de regular a síntese e a liberação de uma série de fatores pró-inflamatórios e pró-oxidantes que por sua vez podem levar ao dano e morte de neurônios adjacentes (127). Estudos demonstraram que a superprodução ou agregados protéicos de α-sinucleina na SNc são capazes de ativar microglia (128-130). Modelos animais por meio de tratamento por 6-OHDA (131), MPTP (132, 133) e rotenona (134) demonstram o envolvimento da microglia na DP. Estudos em cultura celular apontam os TNF-α, IFN-γ e quimiocinas MCP1 e CCL2, como co-fatores chaves na ativação da microglia na DP (135). A ativação de microglia está diretamente relacionado à ativação da iNOS, NADPH oxidase e COX-2 (136) e a liberação de fatores pró-inflamatórios como TNF-α, IL-1β, IL-6, ON e (prostaglandina E2) PGE2, que intervém em diversas vias e mecanismos envolvidos no estresse oxidativo e apoptose neuronal (137).

Um dos principais mecanismos encarregado na comunicação neuroimune, ocorre por liberação de glicoproteínas chamadas citocinas. Embora estes

mensageiros químicos sejam tipicamente produzidos por células do sistema imunológico periférico, demonstrou-se nas últimas décadas a produção destas moléculas por células gliais no SNC (138). Níveis de citocinas pró e antiinflamatórias são encontradas aumentadas por insultos imunológicos e traumáticos, agudos e crônicos (139). Algumas citocinas como o TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-1β, são encontradas em altos níveis no cérebro e fluído cérebro-espinal de pacientes parkinsonianos em estudos *post-mortem* (140). Entre as citocinas pró-inflamatórias, foi estabelecido um potente efeito estimulatório sobre microglia e células imunológicas periféricas pelo IFN-γ, podendo ser um crítico determinante da resposta imunológica adaptativa. Além disso, este também pode ser produzido pela microglia (141, 142). Demonstrou-se que o polimorfismo no gene que codifica o IFN-γ esta relacionado à predisposição do desenvolvimento da DP idiopática (143) e que camundongos *knock-out* de genes responsáveis pela produção de IFN-γ ou de seus receptores, foram resistentes ao MPTP (144) e paraquat (145). O tratamento por MPTP demonstrou altos níveis de expressão do IFN-γ e TNF-α, em um primeiro momento após 6-24 horas e após sete dias do tratamento (146).

Fortes evidências implicam o TNF-α como um dos principais reguladores atuantes na fase inicial e tardia da fisiopatologia da DP, pois além de ativar a microglia (121), pode potencializar reações inflamatórias induzindo produção de citocinas que levam a amplificação de ROS, RNS e radicais superóxidos (147, 148). Demonstrou-se uma ação na mitocôndria do TNF-α, promovendo um aumento na produção de ROS (149). O TNF-α está envolvido em vias de sinalizações implicadas na transcrição de genes, promovendo a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (150). Além disso, pode diretamente ativar receptores de membrana do tipo Receptor de fator de necrose tumoral tipo 1 (TNFR1) expressado em neurônios dopaminérgicos, que estão acoplados a vias pró-apoptóticas de morte celular NF-kB, Quinase N-terminal Jun (JNK) e p38 (5, 151, 152). Modelos animais tem demonstrado níveis elevados de TNF-α, bem como de seu RNAm, após administração de 6-OHDA (94) e MPTP (153, 154). Animais desprovidos de receptores para TNF-α apresentam menor capacidade de resposta microglial, bem como menor sensitividade e perda neuronal pelo MPTP (155, 156).

Assim como o TNF- α, a IL-1β é uma importante citocina pró-inflamatória que pode ser liberada por microglias ativas ou astrócitos e está envolvida na neurodegeneração causada por isquemia, traumatismo craniano, derrame, mal de Alzheimer, esclerose múltipla e DP (157). Foi observado aumento nos níveis de RNAm para IL-1β somente na fase inicial da intoxicação pelo MPTP (158). A expressão crônica de IL-1β na SNc induz ativação da microglia e progressiva degeneração dopaminérgica em ratos (159). Demonstrou-se a participação da IL-1β no aumento da produção de α-sinucleína em culturas de neurônios, substratos necessários para produção dos agregados protéicos como o CL (160).

A neuroinflamação bem como o estresse oxidativo estão implicado na morte dos neurônios dopaminérgicos na DP. Os mediadores pró-inflamatórios TNF-α, IFN-γ e IL-1β, podem induzir a expressão de COX-2, iNOs e NADPH oxidase, enzimas que produzem altas taxas de ROS (161, 162). No cérebro, a COX-2 é encontrada em alguns neurônios, astroglia e microglia, sendo que esta última apresenta alta taxa de expressão da enzima e esta envolvida na síntese de prostanóides. A síntese de prostaglandina pela COX-2 pode gerar altas concentrações de ROS (132) e induz ao estresse oxidativo, levando a redução da atividade da GSH e GSH peroxidase e alterações na membrana mitocondrial (121). O emprego de antiinflamatórios não esteróides como o celecoxib, um inibidor seletivo da COX-2 foi capaz de prevenir a degeneração progressiva induzida pela 6-OHDA (163). A iNOs é encontrada nas células gliais encarregadas em produzir o importante mediador químico ON que pode contribuir para a morte dos neurônios dopaminérgicos através das RNS, ou então por mecanismos não muito compreendidos, com ativação de poli-ADP ribose polimerase e de vias dependentes de caspases (164). Camundongos desprovidos do gene para iNOs, foram significantemente mais resistentes ao MPTP (165). A NADPH oxidase é a principal enzima conhecida produtora de ROS em macrófagos e microglia ativados. Deleção de uma subunidade essencial da enzima, reduz a perda neuronal causada pelo MPTP na SNc em camundongos (127).

A ativação da microglia também representa um estado de transição entre a resposta imunológica inata e a resposta imunológica adquirida, pois há a expressão de citocinas (TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-1β, IL-4, IL-10 e TGF-β) e receptores de citocinas nessas células que modulam a resposta de linfócitos T (166). Muito pouco

compreendida é a influência do sistema imune adaptativo na DP. Segundo (Monahan et al., 2008) (167) células residentes do sistema imunológico periférico podem entrar no cérebro, na ocorrencia de alterações na permeabilidade da barreira hemato-encefálica por influência da microglia e astroglia, contribuindo para a neurodegenerção. Em 1988 (McGeer et al., 1988) (168) reportaram a presença de linfócitos T CD8+ na SNc de um paciênte com DP. Em estudos mais recentes (Brochard et al., 2009) (169) demonstraram aumento na densidade de linfócitos T CD8+ e T CD4+ na SNc de animais tratados pelo MPTP. Segundo (Graeber., 2010) (170) os linfócitos T não são usualmente encontrados na SNc de indivíduos com a forma esporádica da doença, assim novos estudos devem ser realizados para sustentar a influência da resposta imunológica adaptativa na DP .

1.5 As linhagens AIRmax e AIRmin

A linha mestra das investigações científicas do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan consiste em estudar o controle genético dos componentes específicos e não específicos da imunidade, envolvendo linhagens de camundongos selecionadas geneticamente segundo a alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) resposta inflamatória aguda. Tais linhagens foram obtidas por seleção genética bidirecional a partir de uma população inicial (F_0) altamente polimórfica, produzida por intercruzamento de oito linhagens isogênicas: A/J, DBA/2J, SWR, SJL/J, P/J, CBA/J, BALB/cJ e C57BL/6J (Figura 4). Os critérios empregados para seleção foram: a capacidade de infiltrado local de leucócitos e liberação de proteínas no exudato em resposta a injeção subcutânea de uma suspensão de poliacrilamida (171, 172). A linhagem AIRmax demonstra níveis de infiltração de leucócitos e concentração de proteínas no exudato 20 e 2,5 vezes, respectivamente, maior que a AIRmin (173). (Biozzi et al., 1998) estudaram os critérios de seleção em várias gerações (F_0 à F_{17}) e definiram que o limite máximo de seleção entre as linhagens para a capacidade de infiltrado local celular ocorre a partir da geração F_{14}, enquanto que para liberação de proteínas a partir da F_{12} (174). As linhagens AIRmax e AIRmin constituem duas populações distintas e os resultados do processo seletivo bidirecional demonstram claramente a regulação poligênica da intensidade da característica, estimando-se a participação de 11 *loci* na regulação de sua expressão (172). Estas linhagens apresentam, entre si, diferenças em patologias importantes como resistência ou

susceptibilidade a infecções bacterianas, neoplasias e desenvolvimento de doenças auto-imunes (175). A linhagem AIRmax demonstrou-se mais resistente à patógenos intracelulares de *Salmonella typhimurium* ou *Listeria monocytogenes* (176), bem como ao desenvolvimento de tumores e metástases cutâneos (177). A linhagem AIRmin foi menos susceptível a manifestação de artrite reumatóide por pristane (178).

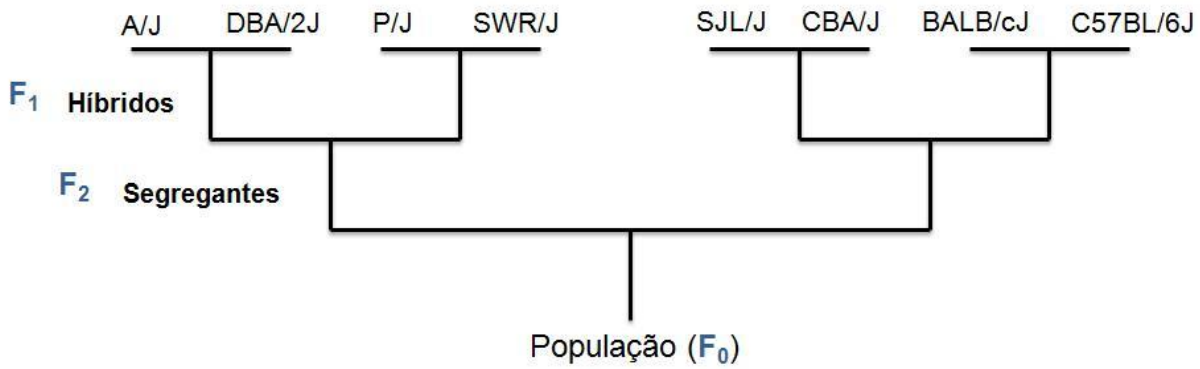

Figura 4: Intercruzamento das oito linhagens isogênicas que deram origem à população inicial (F_0), que gerou as linhagens AIRmax e AIRmin por seleção bidirecional. Fonte: Biozzi et al., 1998 (174).

Todos os estudos publicados que contam com as linhagens AIRmax e AIRmin avaliam os fatores imunológicos e genéticos envolvidos na inflamação aguda periférica. Não há trabalhos que reportam divergências neuroinflamatórias entre as linhagens. Por serem heterogênicas, estas linhagens são úteis para se avaliar a resposta potencial de parcelas da população a determinadas intervenções. Posto isto, e em vista do possível envolvimento de processos neuroinflamatórios no desenvolvimento da lesão parkinsoniana como descrito acima, consideramos de grande interesse avaliar a resposta destas linhagens de camundongos aos agentes MPTP e rotenona. A constatação de que uma destas linhagens pode apresentar grande susceptibilidade a um ou ambos os agentes tóxicos, pode apontar quais os fatores fisiológicos predisponentes a DP nas populações, objeto de intensa investigação internacional e de grande valor preditivo da predisposição individual à doença.

2 OBJETIVO

Neste trabalho investigamos a susceptibilidade de camundongos não isogênicos, selecionados quanto a suas capacidades alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) de resposta inflamatória aguda periférica, aos agentes neurotóxicos MPTP e rotenona.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram empregados camundongos machos jovens (3 meses) para estudos pilotos, e adultos (6meses) pertencentes as linhagens geneticamente selecionadas AIRmax e AIRmin, tendo como controle as linhagens isogênicas BALB/c e C57BL/6. As linhagens AIRmax e AIRmin pertencentes as gerações F_{54} à $F_{57,}$ foram desenvolvidas e fornecidas pelo Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos no biotério de camundongos do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, com temperatura, umidade e luminosidade controladas. Comparou-se a susceptibilidades das linhagens aos agentes neurotóxicos MPTP e rotenona, variando doses e regimes de administração. Todos os experimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Experimentação e Uso de Animais do Instituto Butantan, processo: CEUAIB 397/07, e foram adequados de acordo com a quantidade de animais disponíveis momentaneamente.

3.2 MPTP

O tratamento por MPTP (Sigma 08596-100MG) foi efetuado pelo regime de administração aguda, constituído de 4 e 5 injeções s.c. de 20 mg/kg em intervalos de 2 horas em um único dia (179). O MPTP foi dissolvido em solução 0,9% de cloreto de sódio. Os grupos controles receberam somente salina. As soluções contendo MPTP ou rotenona eram estocadas em recipientes protegidos da luz e devidamente homogeneizadas antes dos tratamentos.

3.3 Rotenona

O tratamento crônico por rotenona (Sigma R-8875-10G) contou com infusão prolongada s.c. da droga, por meio de mini-bombas osmóticas de infusão Alzet (Figura 5) pelo período mínimo de 28 dias, em doses de 3, 6 e12 mg/kg/dia (82). As cirurgias de implantação foram realizadas sob anestesia por isofluorano em sistema aberto, com vaporizador Matrix VIP3000, purificador de carvão ativado, na dosagem de 2 a 4% em oxigênio medicinal. Os animais foram previamente depilados próximo a região cervical, onde foi feita uma pequena incisão cutânea, com posterior implantação subcutânea da bomba e fechamento da incisão por clipagem. As mini-

bombas osmóticas foram preenchidas antes das cirurgias com solução veículo contendo 50% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 50% polietileno glicol (PEG) que foram implantadas nos grupos controles, e veículo + rotenona nos grupos tratados, de modo que as doses de 3, 6 e 12 mg/kg de rotenona fossem liberada num período de 24 horas, sendo que o fluxo nominal de liberação da bomba é de 0,25 µL por hora. O tratamento sub-crônico contou com injeção i.p. de rotenona na dose de 3 mg/kg/dia durante o período de 10 dias. A droga foi dissolvida em veículo contendo 2% DMSO e 98% óleo de girassol. Os grupos controles receberam somente o veículo.

Figura 5: Ilustração representativa de uma mini-bomba osmótica Alzet.

3.4 Avaliação comportamental (Rotarod)

A avaliação da coordenação motora foi realizada no Rotarod 47600 Ugo Basile (Figura 6), em paradigma de observação de 5 minutos em velocidade crescente de rotação de 4 a 40 rpm, modificado posteriormente para 5 a 50 rpm, baseado em (180). Os grupos experimentais foram submetidos a treinamentos prévios de três dias antes de realizar o teste no dia 0 antes do tratamento. Na avaliação comportamental os animais são condicionados a manter-se em equilíbrio e

em constante movimento sobre uma haste cilíndrica que, com o tempo, acelera em rampa de acordo com parâmetros ajustados no próprio aparelho. São marcados os tempos de persistência de cada indivíduo sobre a barra em três baterias de teste, nos tempos de tratamento (TT): 0, 15 e 30 dias após o tratamento para o MPTP e 0, 15, 30 e 45 para rotenona. Somente o melhor tempo de persistência de cada animal foi considerado em cada TT e com a média total por grupo, é traçada uma relação com quatro fatores: Linhagem (BALB/c, C57BL/6, AIRmax e AIRmin) x Tratamento (tratado ou controle) X Tp (média dos melhores tempo de persistência por grupo) x TT.

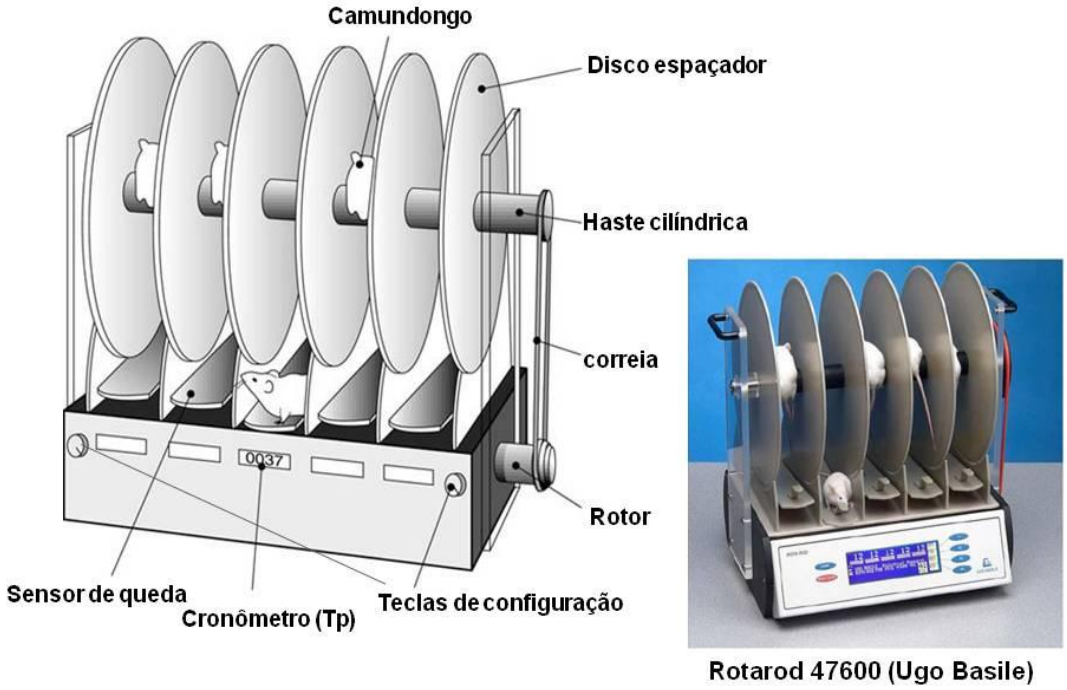

Figura 6: Ilustrações representativas do aparato de avaliação motora, Rotarod Ugo Basile. Fonte: Carter et al., 2001 (181).

3.5 Quantificação da lesão neuronal

Foram empregados métodos imunohistoquímicos (IHQ) contra tirosina-hidroxilase para avaliar a ocorrência de lesão estriatal e nigral causadas pelo MPTP e rotenona em camundongos. A imunohistoquímica foi realizada no laboratório de patologia do hospital Sírio e Libanês, sob a supervisão da Dra. Kátia R.M. Leite, seguindo o protocolo descrito por (Hamre et al., 1999) (182). Resumidamente, por

meio de micrótomo realizam-se cortes de 10 μm, modificado posteriormente para 20μm, dos blocos de parafina representativos das regiões cerebrais relativas à SNc e estriado colhidos em lâminas silanizadas. Os cortes foram submetidos a reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-tirosina hidroxilase policlonal (Abcam ab6211) na diluição de 1:750. O protocolo constitui-se de desparafinização com incubação por 12 horas em estufa a 60 ºC, seguida de banhos em xilol por 40 minutos a temperatura ambiente e hidratação em banhos decrescentes de etanol (etanol absoluto, 95%, 80% e 50%) por 5 minutos cada. Após lavagem com água corrente o material foi submetido à recuperação antigênica por calor, utilizando para tanto, tampão citrato 1 mM, pH 6,0 em banho de vapor por 30 minutos. O material imerso em tampão citrato foi resfriado a temperatura ambiente por 20 minutos e lavado em água corrente. Segue-se bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogenio a 3% (10 vol.) em dois banhos de 10 minutos cada. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente e em seguida com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6 por 5 minutos. Os anticorpos primários anti-TH, diluídos em albumina de soro bovino e tampão fosfato-salina foram incubados por 12 horas a 4 ºC. As lâminas foram lavadas com Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6 por 5 minutos e em seguida, utilizando o *kit Labelled Streptavidin Biotin* (*LSAB+ System-HRP DakoCytomation código K0690*) realizou-se a marcação com o anticorpo secundário e a revelação com streptavidina-peroxidase por meio da adição de 100 µL do anticorpo secundário (*Biotinylated Link Universal*) e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente seguida de lavagem com Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6 por 5 minutos. As lâminas foram então incubadas com 600 µL de solução substrato-cromógeno constituída de 1mg/ml de diaminobenzidina em tampão fosfato-salina e 0,02% de peróxido de hidrogênio, pH 7,4 por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente, seguido de banho de hidróxido de amônio 0,2% e nova lavagem em água corrente. O material foi desidratado em banhos crescentes de etanol (etanol 50%, 80%, 95% e absoluto) por 5 minutos cada e diafanizado em xilol. As lâminas foram montadas com bálsamo e lamínula. A observação e registro das lâminas foram realizados em microscópio óptico, em aumento de 40, 100 e 200 x, sendo capturadas imagens em máquina Nikon de 10 campos de cada área.

3.6 Análise estatística

Empregou-se ANOVA com três vias: Linhagem (BALB/c, C57BL/6, AIRmax e AIRmin); Tratamento (Controle e Tratado) e medida repetida no tempo de tratamento (0,15, 30 e 45 dias). Os dados foram transformados em logaritmo para serem analisados. Quando necessário foram utilizados testes de comparações múltiplas pelo método de Tukey ou Bonferroni. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Foram analisados somente os experimentos, cujo número de animais (*n*) por grupo fosse maior ou igual a 4. Os estudos pilotos não foram analisados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MPTP

Iniciamos a investigação executando um estudo piloto utilizando a dosagem e metodologia empregadas por grande parte dos autores da literatura, e outro que contou com o acréscimo ao protocolo de mais uma dose da droga. Ambos empregaram camundongos machos jovens de 3 meses de idade das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin. Não foram empregados animais controle nestes experimentos devido ao pequeno número de animais disponíveis no momento. No primeiro estudo piloto, grupos de *n*=8 animais por linhagem receberam o regime agudo de tratamento que contou com quatro injeções s.c. de 20 mg/kg de MPTP a cada duas horas em um único dia. A avaliação comportamental no Rotarod empregou o paradigma de observação de 5 minutos em velocidade crescente de rotação de 4 a 40 rpm.

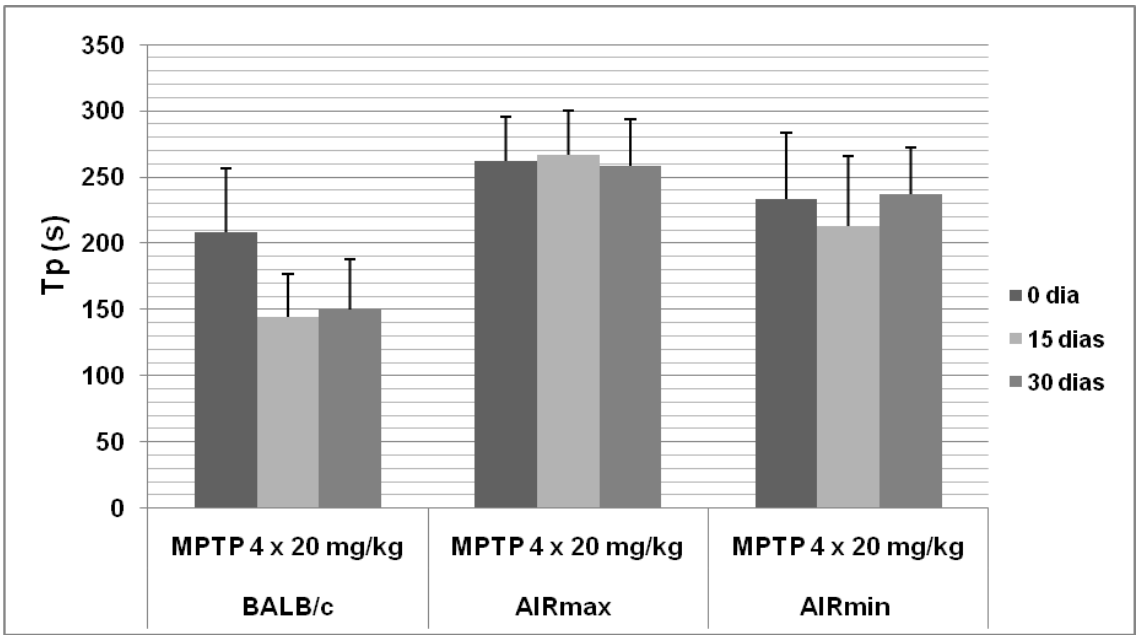

Gráfico 1: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 4 à 40rpm durante 5 minutos, empregando camundongos jovens (3 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após o tratamento de 4 x 20 mg/kg do MPTP. Foram avaliadas as média dos melhores tempos de persistência por grupo (Tp) antes (0 dia), 15 e 30 dias após o tratamento. BALB/c (*n*=8); AIRmax (*n*=8) e AIRmin (*n*=8). Barra representa o desvio padrão.

Os testes realizados no Rotarod não demonstraram queda de coordenação motora em nenhuma das linhagens. Procedemos então à avaliação da possível lesão pelo estudo de IHQ contra TH. Este procedimento foi realizado no laboratório de patologia do hospital Sírio Libanês. Devido a problemas técnicos, a grande maioria das lâminas não apresentou tecidos cerebrais íntegros, os cortes se dispunham quebradiços com falta de estruturas cerebrais importantes. Os poucos cortes que puderam ser avaliados não mostraram sinais claros de lesão.

Como não observarmos qualquer tipo de alteração motora decorrente dos tratamentos, semelhantes aos sintomas encontrados em animais parkinsonianos como bradicinesia, instabilidade postural, marcha instável e rigidez, e por não encontrarmos qualquer sinal que nos demonstrasse a ocorrência de lesão nigral ou estriatal pela IHQ, modificamos o protocolo de tratamento pelo MPTP, acrescentando mais uma dose de 20 mg/kg, totalizando cinco doses. Foram empregados grupos de *n*=10, das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin:

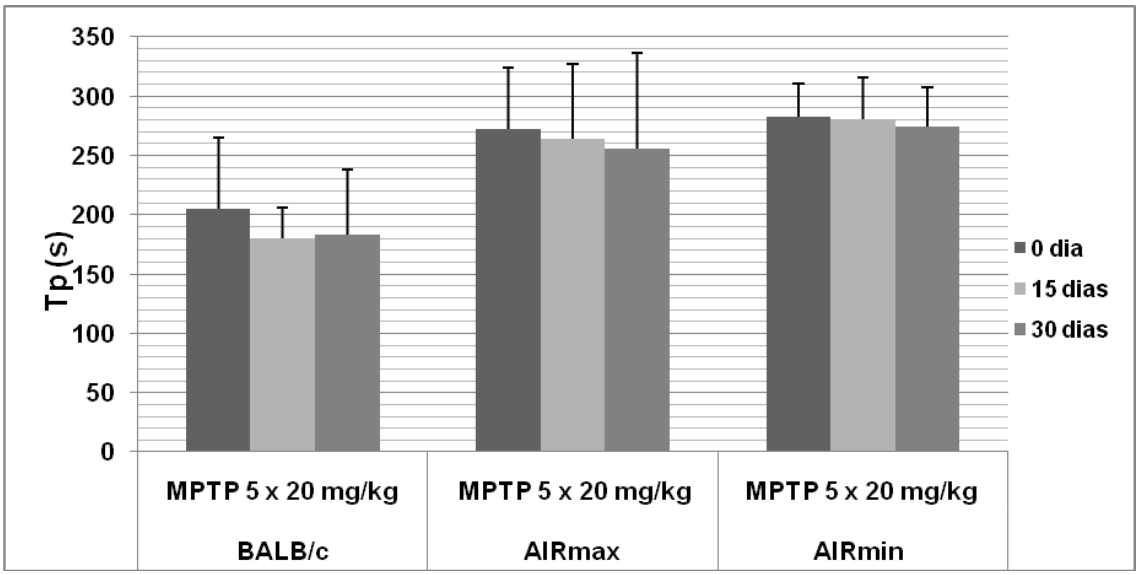

Gráfico 2: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 4 à 40 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos jovens (3 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após o tratamento de 5 x 20 mg/kg do MPTP. Foram avaliadas as média dos melhores tempos de persistência por grupo (Tp) antes (0 dia), 15 e 30 dias após o tratamento. BALB/c (*n*=9); AIRmax (*n*=8) e AIRmin (*n*=8). Barra representa o desvio padrão.

O novo tratamento de cinco doses de MPTP a cada 2 horas em um único dia mostrou ser tóxico levando a óbito um indivíduo da linhagem BALB/c, dois AIRmax e

dois AIRmin . Somente os animais que resistiram ao tratamento foram considerados. Os testes de avaliação motora novamente não demonstraram perda de coordenação motora significativa. Quanto ao estudo IHQ, não foi constatado qualquer tipo de dano nas regiões em estudo, nas poucas lâminas em condição de serem examinadas.

(Ohashi et al., 2006) (76) estudaram a relação entre a idade e a gravidade da lesão neural causada pela intoxicação do MPTP e demonstraram que camundongos adultos (6 a 7 meses) são mais sensíveis ao tratamento pela droga que os jovens (2 a 3 meses), que não são afetados. Após os estudos pilotos empregando animais jovens, demos continuidade à nossa investigação empregando animais mais velhos e para tanto, passamos a manter animais em nosso biotério para que atingissem a idade adequada. Tivemos dificuldades em conseguir camundongos adultos, pois o bioterio do instituto não mantém animais com idade superior a 3 meses.

Tendo em vista que alguns animais quando submetidos ao Rotarod nos teste de avaliação motora, alcançavam a rotação máxima de 40 rpm sem cair, modificamos o parâmetro de velocidade para 5 a 50 rpm, que foi empregado nos experimentos seguintes.

Após breve período em que foram mantidos os animais em nosso biotério para adquirirem idade, demos continuidade ao estudo da ação do MPTP em animais adultos. Em um dos experimentos, empregamos somente as linhagens AIRmax e AIRmin, já que os BALB/c e C57BL/6 no momento não apresentavam a idade adequada. Empregamos o tratamento agudo de cinco injeções de 20 mg/kg a cada duas horas. Os grupos tratados contaram com n=8 e controle n=2 por linhagem. Como não havia grande quantidade de animais por linhagem disponível, optou-se por trabalhar com um baixo *n* controle. Após a administração da droga alguns, animais não resistiram ao tratamento indo à óbito: quatro indivíduos da linhagem AIRmax (50%), um AIRmin controle e um tratado (12,5%).

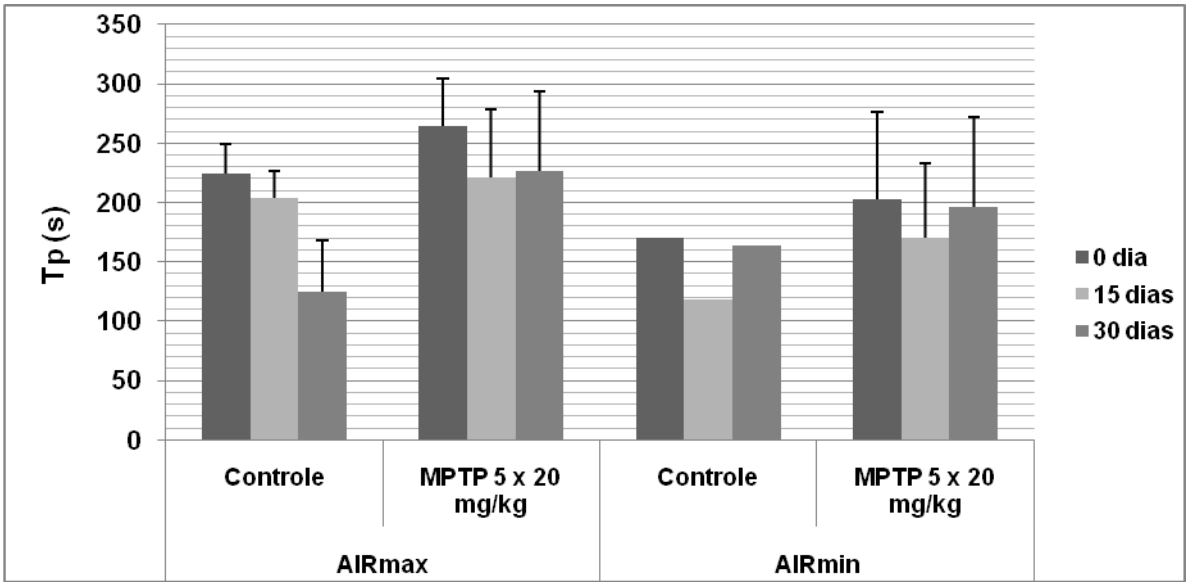

Gráfico 3: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 5 à 50 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos adultos (6meses) das linhagens AIRmax e AIRmin antes e após o tratamento de 5 x 20 mg/kg do MPTP. Foram avaliadas as média dos melhores tempos de persistência por grupo (Tp) antes (0 dia), 15 e 30 dias após o tratamento. AIRmax (Cont. *n*=2; Trat. *n*=4) e AIRmin (Cont. *n*=1; Trat. *n*=7). Barra representa o desvio padrão.

A avaliação motora no Rotarod após mudanças no parâmetro de velocidade do Rotarod, demonstrou ser mais efetiva de modo que poucos animais chegaram a velocidade máxima de 50 rpm. Não se observou perda de coordenação motora significatíva em nenhuma das linhagens. Quanto aos animais de idade mais avançada, os AIRmax demontraram ser mais sensíveis ao tratamento agudo de cinco doses, havendo morte de 50% dos indivíduos.

A investigação imunohistoquímica deste material não mostrou lesões quantificáveis. O procedimento de inclusão e corte foram transferidos para nosso laboratório e mantivemos apenas o processo de IHQ nos laboratórios do HSL.

Tendo em vista que o tratamento de cinco doses mostrou-se muito tóxico aos animais adultos, empregamos o tratamento de quatro doses. Para tal foram empregados camundongos: 21 BALB/c (Cont. *n*=9; Trat. *n*=12), 30 C57BL/6 (Cont. *n*=10; Trat. *n*=20), 20 AIRmax (Cont. *n*=9; Trat. *n*=11) e 28 AIRmin (Cont. *n*=9; Trat. *n*=19). Alguns animais não suportaram ao tratamento indo a óbito: sete BALB/c (58,3%), quatro C57BL/6 (20%), um AIRmax (9%) e quatro AIRmin (21%).

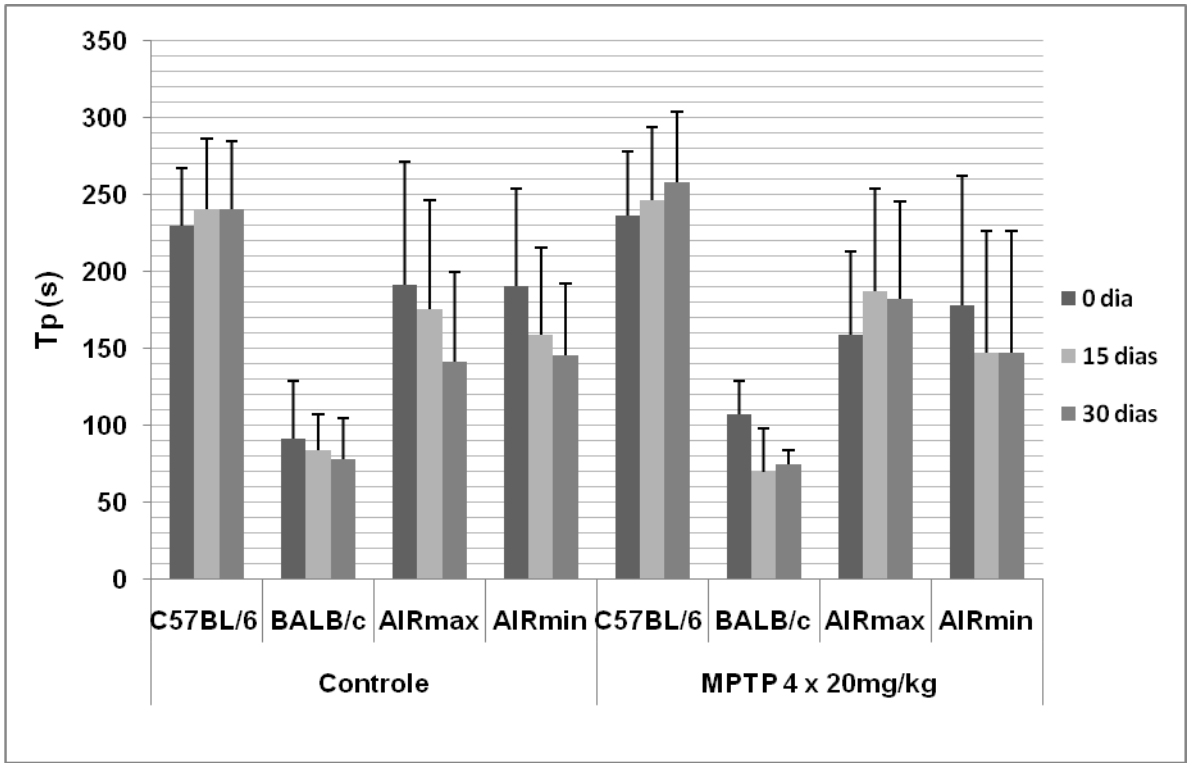

Gráfico 4: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 5 à 50 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos adultos (6 meses) das linhagens BALB/c, C57BL/6, AIRmax e AIRmin antes e após o tratamento de 4 x 20 mg/kg do MPTP. Foram avaliadas as média dos melhores tempos de persistência por grupo (Tp) antes (0 dia), 15 e 30 dias após o tratamento. BALB/c (Cont. *n*=9; Trat. *n*=5), C57BL/6 (Cont. *n*=10; Trat. *n*=16), AIRmax (Cont. *n*=9; Trat. *n*=10) e AIRmin (Cont. *n*=9; Trat. *n*=15). Não foi detectada diferença significante entre animais tratados ou não tratados com MPTP, independente da linhagem (p=0.999), mas houve diferença significante na performace no Rotarod entre C57BL/6 e Balb/c, entre C57BL/6, Balb/c e AIRmax, entre C57BL/6, Balb/c e AIRmin, independente do tratamento, e entre AIRmax e AIRmin somente no tempo de tratamento 15 dias (grupos tratados), (Bonferroni, p<0,05). Barra representa o desvio padrão.

O teste de avaliação motora no Rotarod, bem como a análise estatística dos dados, não demonstraram queda de coordenação motora em nenhuma linhagem. A IHQ dos cérebros dos animais, não permitiu fazer afirmações a respeito da possível lesão deste tecido pois o preparo das lâmina ficou técnicamente comprometido. O tecido se desprendeu das lâminas durante o processamento, mesmo tendo sido cortado em espessura maior (20 µm).

Estudos tem demonstrado que diversos fatores como espécies, linhagens, sexo, idade, rota de administração e regime de tratamento influenciam a reprodutibilidade da lesão nigroestriatal pelo MPTP. Espécies filogeneticamente mais próximas aos seres humanos são mais vulneráveis à toxina (183). (Sundstrom e

Samuelsson., 1997) compararam o efeito do MPTP sobre ratos e camundongos, demonstrando que doses capazes de lesar a SNc de camundongos, não eram capazes em ratos (184). Outro grupo demonstrou que alta dose da droga administrada junto a guanetidina, um inibidor seletivo da liberação de catecolaminas no sistema nervoso periférico, foi capaz de causar lesão em ratos (185), evitando possíveis mortes por influencia da droga, principalmete protegendo contra alterações no ritmo cardíaco e queda da presão sanguinea, sintomas observados por intoxicação pelo MPTP sistêmico (183). Um estudo comparativo entre linhagens de camundongo demonstrou que a linhagem BALB/c não desenvolve lesão nigral em doses de MPTP capazes de lesar camundongos C57BL/6 (186). Foi demonstrado que a lesão provocada pelo MPTP em camundongos C57BL/6 esta relacionada a idade, sendo mais acentuada em animais adultos ou velhos (76). (Hamre et al., 1999) (182) estudaram a susceptibilidade entre linhagens de camundongos ao MPTP, avaliando genótipos associados à toxicidade, e concluíram que genes de herança autossômica dominante estariam relacionados à sensibilidade. (Sonsalla e Heikkila, 1986) (187) demonstraram a influência da dose e intervalo entre as doses no tratamento, reportando ausência ou ocorrência de lesão em camundongos da mesma linhagem, submetidos a diferentes tratamentos, mas com equivalência na dose total. A associação destes fatores explicam a alta taxa de mortalidade observada em nosso experimento empregando o tratamento agudo de cinco doses de 20 mg/kg. A adição de mais uma dose pode ter ultrapassado o limiar de tolerância das linhagens, causando alterações e falência de sistemas periféricos autonômicos. Nos experimentos empregando animais mais velhos observou-se menor tolerância ao tratamento, quando comparados aos animais mais jovens. A ausência de lesão e sinais comportamentais da DP, podem ser explicadas pela resistência das linhagens AIRmax e AIRmin ao MPTP, além da BALB/c já reportada em estudos anteriores. Já a linhagem isogênica C57BL/6 é a mais empregada em estudos da DP e esperava-se a sua sensibilidade ao MPTP. Um estudo realizado por (Heikkila, 1985) (188) demonstrou diferenças nas susceptibilidades ao MPTP por camundongos da mesma linhagem fornecidos por diferentes fornecedores nos Estados Unidos. Animais produzidos por dois de três criadores testados apresentavam resistência à droga quando avaliados os níveis de dopamina e de seus metabólitos no estriado. Os camundongos C57BL/6 empregados em nosso trabalho foram fornecidos pelo biotério central de camundongos do Instituto Butantan

e provavelmente esta população, pode também ser resistentes ao MPTP. Um estudo comparativo empregando camundongos C57BL/6 de diferentes fontes se faz necessário, para confirmar esta observação.

4.2 Rotenona

O estudo piloto para a rotenona contou com o tratamento por infusão prolongada da droga por 28 dias em doses de 3 mg/kg/dia em mini-bombas osmóticas de infusão. Animais de 3 meses de idade das linhagens AIRmax, AIRmin e BALB/c foram empregados. Os testes de avaliação motora no Rotarod foram realizados 15 e 30 dias após a implantação das bombas osmóticas. Após a avaliação de 30 dias as bombas foram retiradas e outro teste foi realizado 15 dias depois da retirada (teste aos 45 dias), somente os animais sobreviventes a todo o tratamento foram considerados. O paradigma de observação foi de 5 minutos em velocidade crescente de rotação de 4 a 40 rpm. Contamos com 10 animais BALB/c (Cont. *n*=4; Trat. *n*=6), 8 AIRmax e 10 AIRmin, sendo que para estas linhagens, não foram empregados animais controle. Durante a padronização do método cirúrgico para a implantação das mini-bombas, foram a óbito dois animais da linhagem BALB/c por conta da alta concentração de anestésico. Ao longo do tratamento um AIRmax e dois AIRmin não resistiram e foram descartados da análise estatística e comportamental.

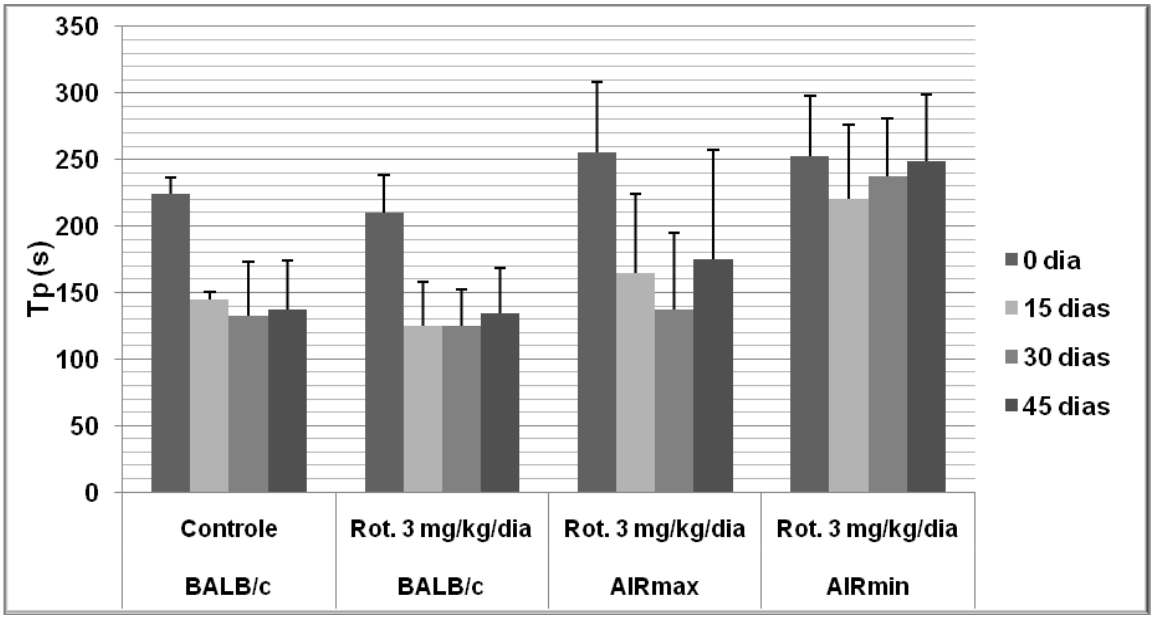

Gráfico 5: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 4 à 40 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos jovens (3 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após tratamento com Rotenona (3 mg/kg/dia). Foram avaliadas as média dos melhores tempos de persistência por grupo (Tp) antes (0 dia), 15, 30 e 45 dias após o tratamento. BALB/c (Cont. *n*=2; Trat. *n*=6); AIRmax (*n*=7); AIRmin (*n*=8). Barra representa o desvio padrão.

O teste de avaliação motora no Rotarod e a análise estatística, não demonstraram queda de coordenação motora em nenhuma das linhagens estudadas na dose de 3 mg/kg/dia de rotenona. Levando em consideração os resultados obtidos no estudo piloto e pensando na otimização do tratamento, realizamos outros experimentos empregando doses maiores de 6 mg/kg/dia e 12 mg/kg/dia, em animais de 6 meses de idade.

Para o tratamento de 6 mg/kg/dia de rotenona, foram empregados camundongos das três linhagens: 18 BALB/c (Cont. *n*=8; Trat. *n*=10), 19 AIRmax (Cont. *n*=8; Trat. *n*=11) e 17 AIRmin (Cont. *n*=6; Trat. *n*=10). Seguimos o mesmo protocolo proposto para preparação, implantação das mini-bombas e avaliação do desempenho motor, agora empregando paradigma de observação de 5 minutos em velocidade crescente de rotação de 5 a 50 rpm.

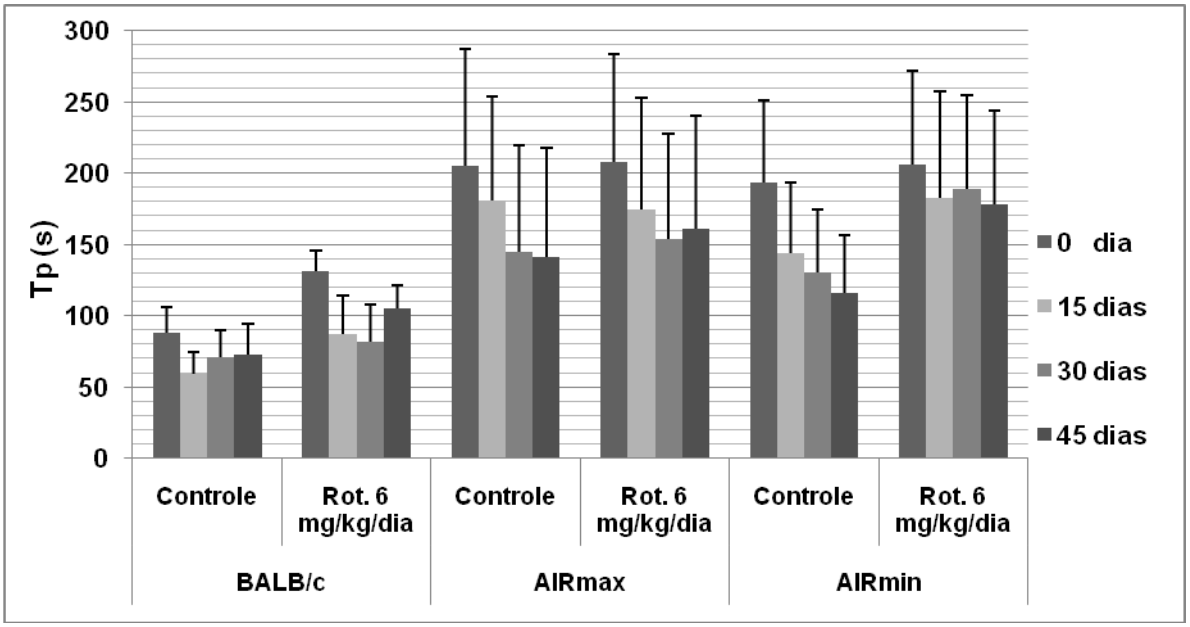

Gráfico 6: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 5 à 50 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos adultos (6 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após tratamento com a Rotenona (6 mg/kg/dia). Foram avaliadas as média dos melhores tempos de persistência por grupo (Tp) antes (0 dia), 15, 30 e 45 dias após o tratamento. BALB/c (Cont. *n*=8; Trat. *n*=6); AIRmax (Cont. *n*=8; Trat. *n*=9); AIRmin (Cont. *n*=6; Trat. *n*=9). Não foi detectada diferença significante entre animais tratados ou não tratados com Rotenona (6 mg/kg/dia), independente da linhagem (p=0.542), mas houve diferença significante na performace no Rotarod entre BALB/c e AIRmax e entre BALB/c e AIRmin (Bonferroni, p<0,05) independente do tratamento. Barra representa o desvio padrão.

Ao longo de todo o experimento, ocorreram mortes de animais que não resistiram ao tratamento por 6 mg/kg/dia, sendo quatro animais da linhagem BALB/c (40%), dois AIRmax (18%) e um AIRmin (10%), demonstrando maior sensibilidade à droga indivíduos BALB/c.

De acordo com o protocolo deste projeto, após os 30 dias de tratamento, é realizada a retirada das mini-bombas dos animais, para depois nos testes de 45 dias, serem medidos os tempos de persistência na ausência das mini-bombas. Após a retirada, rotineiramente são conferidos os conteúdos das mini-bombas para verificar o tratamento. Durante tal procedimento observamos que 37,5% das mini-bombas encontravam-se parcialmente cheias e que a saída dos seus reguladores de fluxo apresentavam-se obstruídas por precipitação da droga, fato que comprometeu a avaliação dos resultados. Quanto a análise de IHQ, foi observada perda de corpos celulares nigrais positivos para marcação anti-TH em um índivíduo da linhagem AIRmin (Figura 8), sugerindo lesão neuronal, mas o estado dos cortes de SNc

adjacentes não permitiu quantificar o grau da lesão, pois estes apresentavam-se danificados.

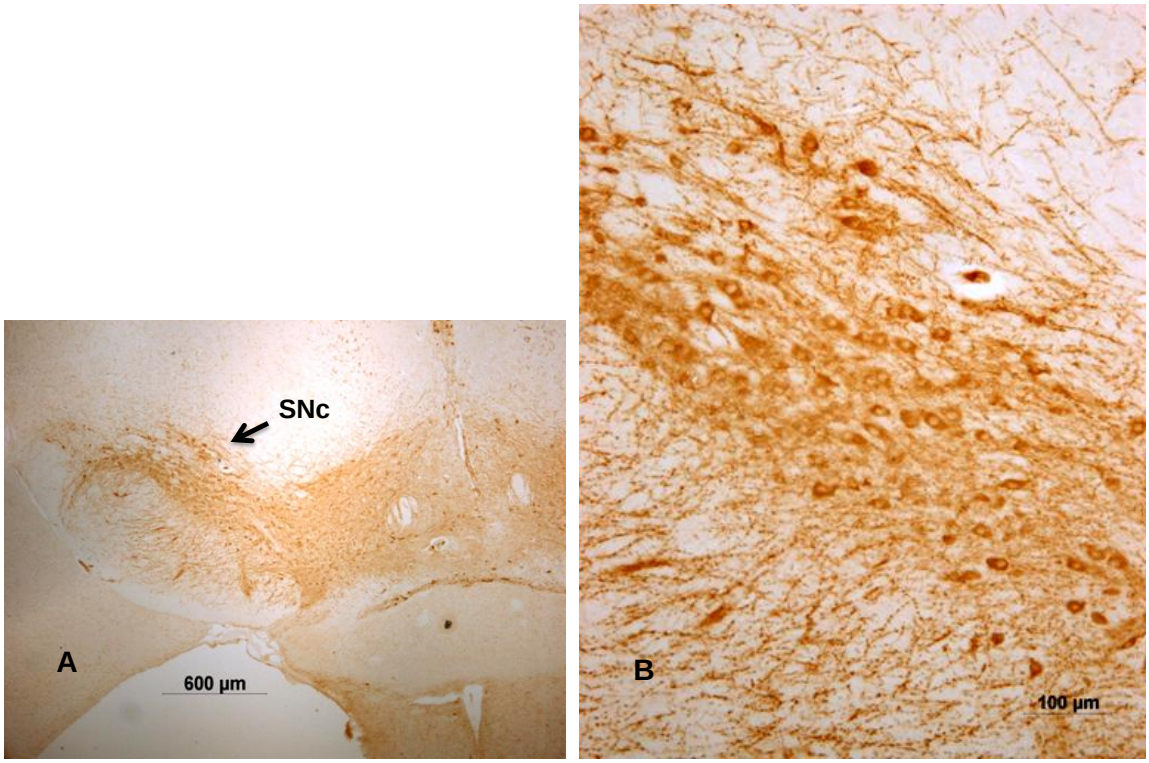

Figura 7: Imunohistoquímica contra tirosina hidroxilase da região da substância negra. Cortes de 10 µm em aumento de 40 x (A) e 200 x (B). AIRmin Controle. **SNc:** Substância negra compacta.

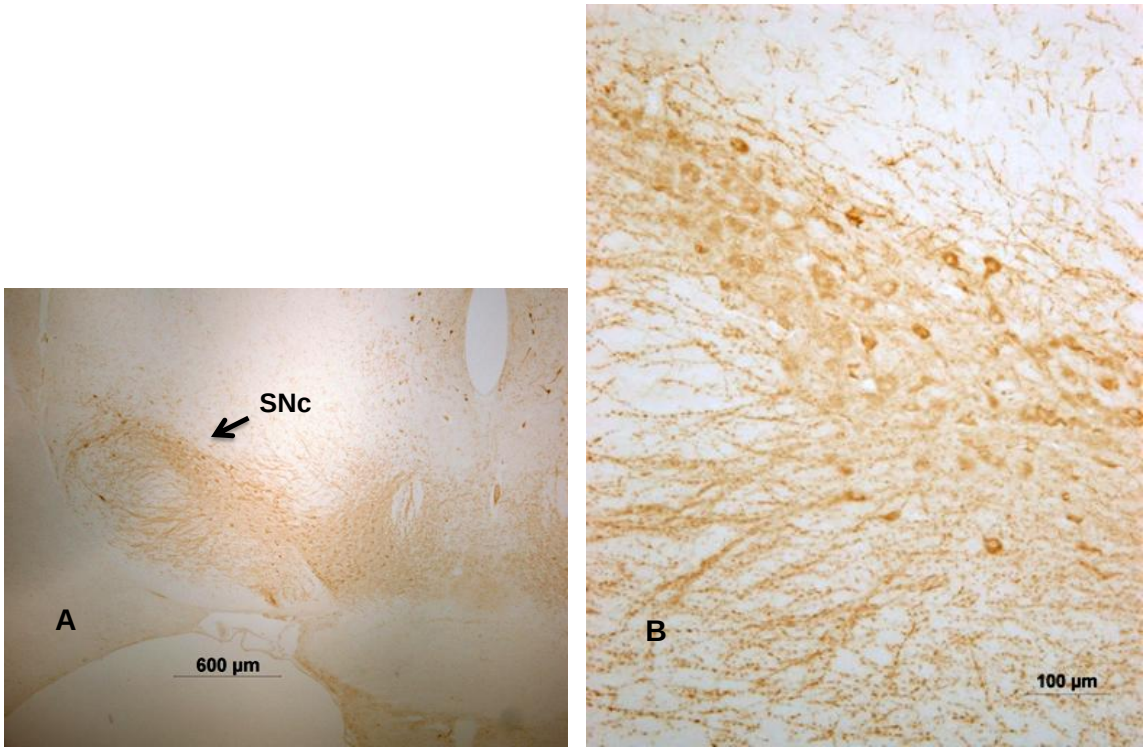

Figura 8: Imunohistoquímica contra tirosina hidroxilase da região da substância negra. Cortes de 10 µm em aumento de 40 x (A) e 200 x (B). AIRmin tratado com rotenona 6 mg/kg/dia. **SNc:** Substância negra compacta.

No experimento de 12 mg/kg/dia de rotenona, os reguladores de fluxo das mini-bombas foram retirados para tentar evitar entupimentos. Os grupos contaram com BALB/c (Cont *n*=10 e Trat *n*=12), AIRmax (Cont *n*=10 Trat *n*=15) e AIRmin (Cont *n*=10 Trat *n*=16).

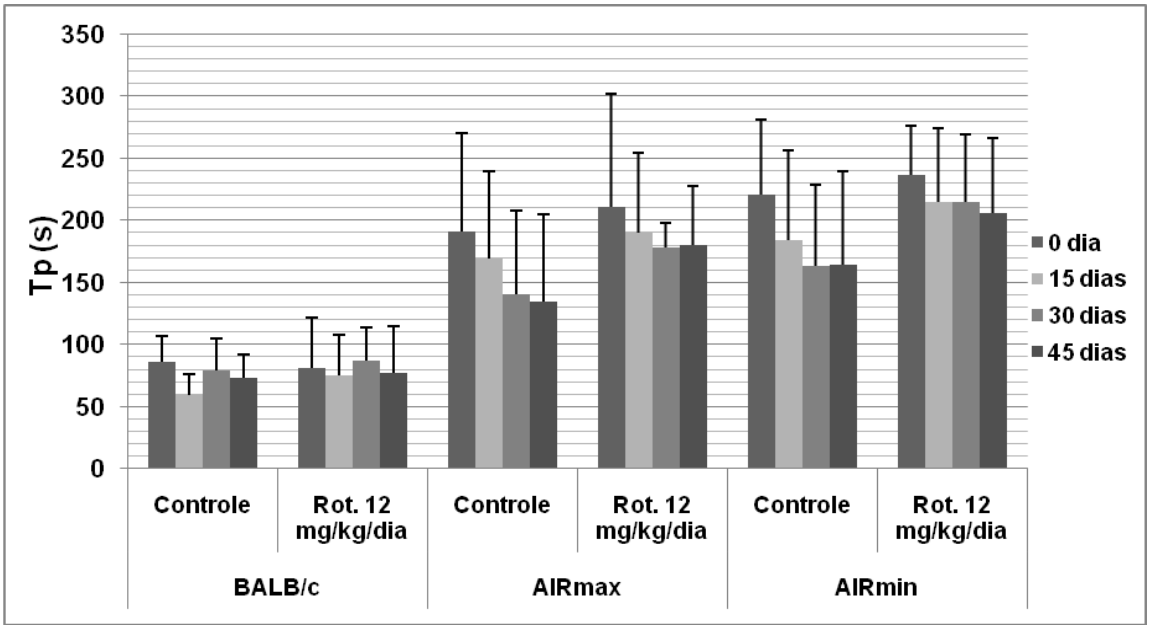

Gráfico 7: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 5 à 50 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos adultos (6 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após tratamento com Rotenona (12 mg/kg/dia). Foram avaliadas as média dos melhores tempos de persistência por grupo (Tp) antes (0 dia), 15, 30 e 45 dias após o tratamento. BALB/c (Cont. *n*=10; Trat. *n*=7); AIRmax (Cont. *n*=10; Trat. *n*=6); AIRmin (Cont. *n*=10; Trat. *n*=5). Não foi detectada diferença significante entre animais tratados ou não tratados com Rotenona (12 mg/kg/dia), independente da linhagem (p=0.627), mas houve diferença significante na performace no Rotarod entre BALB/c e AIRmax e entre BALB/c e AIRmin (Bonferroni, p<0,001) independente do tratamento. Barra representa o desvio padrão.

Obtivemos alta taxa de mortalidade de animais pertencentes aos grupos tratados por rotenona 12 mg/kg/dia: cinco BALB/c (41,6%), nove AIRmax (60%) e onze AIRmin (68,7%). Quanto a análise comportamental e estatística, não foi observada a perda de coordenação motora em nenhuma das linhagens, mas quando levado em consideração as altas taxas de mortalidade aos tratamentos, observou-se maior sensibilidade à droga pela linhagen AIRmin, seguida pela AIRmax e BALB/c. Nenhum sintoma de parkinsonismo foi observado nos animais sobreviventes ao tratamento. A retirada do regulador de fluxo das bombas osmóticas não evitou a precipitação da droga e 55,6% das bombas apresentavam-se parcialmente cheias deixando dúvidas em relação ao tratamento. Quanto a IHQ, não

foi observada redução de corpos celulares nigrais positivos para anti-TH nos cérebros dos animais tratados sobreviventes nas lâminas em condições de serem avaliadas.

Em nosso estudo piloto empregando a dose de 3 mg/kg/dia de rotenona, a taxa de mortalidade não foi tão elevada, talvez por se tratar de camundongos jovens, estes podem apresentar maior resistência e tolerancia à droga. Outro fato positivo foi a ausência de entupimento das mini-bombas. Sendo assim, desafiamos esta mesma dose, agora em animais de 6 meses pensando no insucesso dos tratamentos anteriores. Para tal empregamos 30 C57BL/6 (Cont. *n*=10; Trat. *n*= 20), 13 AIRmax (Cont. *n*=4; Trat. *n*=9) e 11 AIRmin (Cont. *n*=4; Trat. *n*=7), no momento não haviam animais BALB/c na idade adequada disponíveis. Durante o tratamento somente três animais C57BL/6 (15%) foram à óbito.

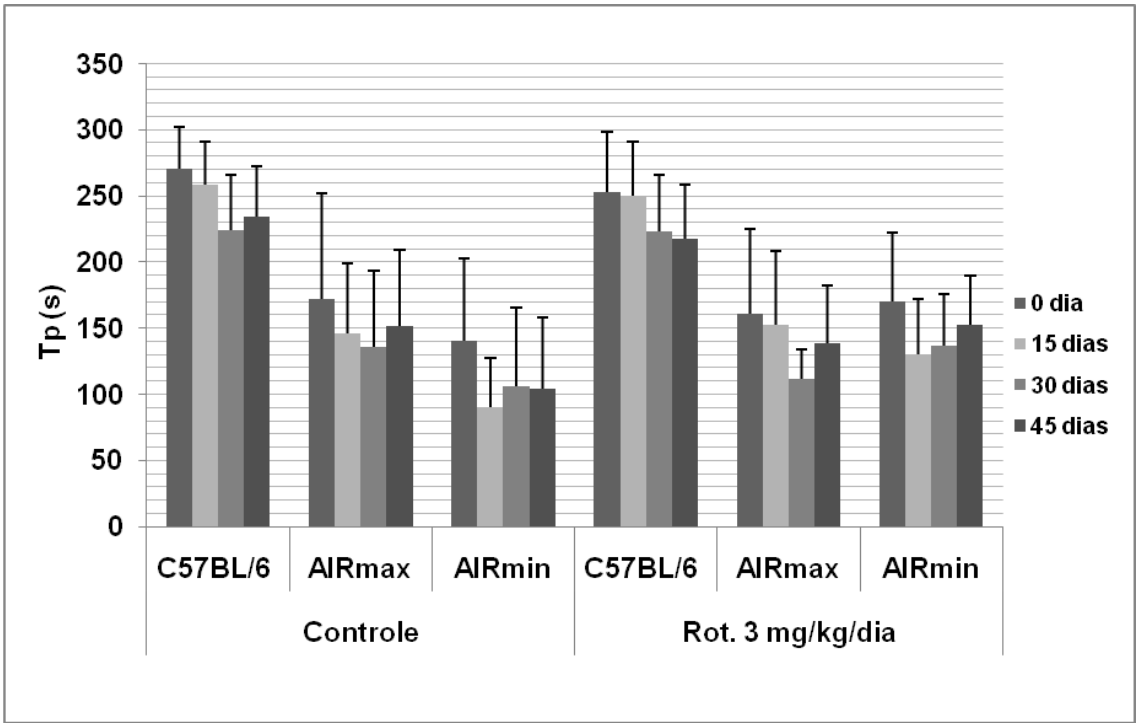

Gráfico 8: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 5 à 50 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos adultos (6 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após tratamento com a Rotenona (3 mg/kg/dia). Foram avaliadas as média dos melhores tempos de persistência por grupo (Tp) antes (0 dia), 15, 30 e 45 dias após o tratamento. C57BL/6 (Cont. *n*=10; Trat. *n*=17); AIRmax (Cont. *n*=4; Trat. *n*=9); AIRmin (Cont. *n*=4; Trat. *n*=7). Não foi detectada diferença significante entre animais tratados ou não tratados com Rotenona (3 mg/kg/dia), independente da linhagem (p=0.234), mas houve diferença significante na performace no Rotarod entre C57BL/6 e AIRmax, entre C57BL/6 e AIRmin, e entre AIRmax e AIRmin somente no tempo de tratamento de 15 dias (Bonferroni, p<0,05), independente do tratamento. Barra representa o desvio padrão.

Os testes comportamentais efetuados no Rotarod após 15, 30 e 45 dias do tratamento por rotenona na dose de 3 mg/kg/dia, não demonstraram perda de coordenação motora em nenhuma das linhagens. A análise estatística suportou tal afirmação. A IHQ foi novamente comprometida por razões técnicas. O tratamento na dose de 3 mg/kg/dia apresentou menos problemas de entupimento das mini-bombas, como reportado em outras doses.

O método de infusão prolongada s.c. de rotenona por meio de mini-bombas osmóticas estabelecido por (Betarbet et al., 2000) (82), tem sido muito empregado em modelos animais para o estudo da DP. (Fleming et al., 2004) (189) realizaram um estudo empregando tal modelo em ratos Lewis, e demonstraram uma alta taxa de mortalidade de animais que na dose de 2,5 mg/kg/dia foi de 64% e 3 mg/kg/dia foi de 91%, dos poucos animais sobreviventes somente 23% demonstraram perda substâncial das regiões marcadas pelo anti-TH, comprovando a baixa efetividade deste tratamento. Também constataram a falta de correlação entre a perda de neurônios dopaminérgicos da SNc, com os sinais comportamentais da doença como bradicinesia, instabilidade postural, marcha instável e rigidez, animais que apresentavam lesão não apresentavam alterações comportamentais e vice-versa. Em nossos experimentos com camundongos as doses de 6 e 12 mg/kg/dia causaram alta taxa de mortalidade de animais: Balb/c 40% e 41,6%, AIRmax 18% e 60% e AIRmin 10% e 68%, respectivamente. Somente na dose de 6 mg/kg/dia, conjecturamos redução de corpos celulares nigrais em um indivíduo AIRmin. Poucos são os trabalhos envolvendo modelos animais para Parkinson que reportam a ineficácia do modelo. Informações como mortalidade e taxas de insucessos são omitidas. Tais informações seriam essenciais, e possibilitariam nortear e orientar os grupos de pesquisa que empregam estes modelos.

(Cicchetti et al., 2009) (86) em uma revisão intitulada *"Toxinas ambientais e DP: O que temos aprendido com modelos animais induzidos por pesticidas?",* fazem uma descrição da grande maioria dos modelos animais que empregaram a rotenona para estudos da DP, classificando-os por modo de administração, espécie, grau de lesão nigroestriatal, alterações motoras e toxicidade. Na grande maioria dos estudos empregou-se a via de administração subcutânea, bem como a linhagem de ratos Lewis. Um limitado número de pesquisas tem se dedicado a estudar a

susceptibilidade de camundongos ao pesticida. (Richiter et al., 2007) (190) avaliaram a susceptibilidade de camundongos de 2,5, 5 e 12 meses de idade, da linhagem C57BL/6, aos tratamentos crônicos de 2,5, 4 e 5 mg/kg/dia subcutâneo durante 30-45 dias, e obtiveram alta taxa de mortalidade, particularmente entre animais de 5 meses que receberam a dose de 5 mg/kg/dia. Estes autores não constataram perda de neurônios dopaminérgicos na SNc dos animais que sobreviveram ao tratamento, freqüentemente observado em ratos submetidos a tratamentos semelhantes.

Diante destas dificuldades adotamos outra metodologia baseada no trabalho de (Corona et al., 2010) (191), que empregou injeção i.p. durante 7 dias de 10 mg/kg/dia de rotenona em 100% de azeite de oliva. Estes autores empregaram camundongos da linhagem C57BL/6 e constataram lesão nigral. Em nosso experimento piloto, grupos de 4 indivíduos das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin foram empregados e receberam a dose diária de acordo com o seu peso. No quarto e quinto dia de tratamento foram a óbito 3 AIRmin e 2 BALB/c, consequentemente o tratamento foi suspenso. No sexto dia somente os animais AIRmax sobreviveram ao tratamento, impossibilitando a realização dos testes no Rotarod. Durante o tratatamento observamos uma perda de peso média de 5% em todos os grupos.

Baseado ainda no modelo de (Corona et al., 2010) demos continuidade a nossa investigação alterando alguns parâmetros visando a redução da toxicidade pela rotenona bem como do veículo empregado. Incluímos o DMSO que ajuda na solubilização da rotenona. O método contou com administração i.p. de 3 mg/kg/dia de rotenona durante o período 10 dias, onde a droga foi dissolvida em veículo contendo 2% de DMSO e 98% de óleo de gergelim. Foram empregados camundongos de seis meses de idade das linhagens BALB/c (Cont *n*=10 Trat *n*=13), AIRmax (Cont *n*=8 Trat *n*=10) e AIRmin (Cont *n*=9 Trat *n*=10). Animais controle receberam somente veículo. Durante o tratamento foram a óbito um AIRmax e dois AIRmin e estes útimos desenvolveram sintomas de parkinsonismo como instabilidade postural e rigidez muscular antes de morrer, percebida pela observação direta.

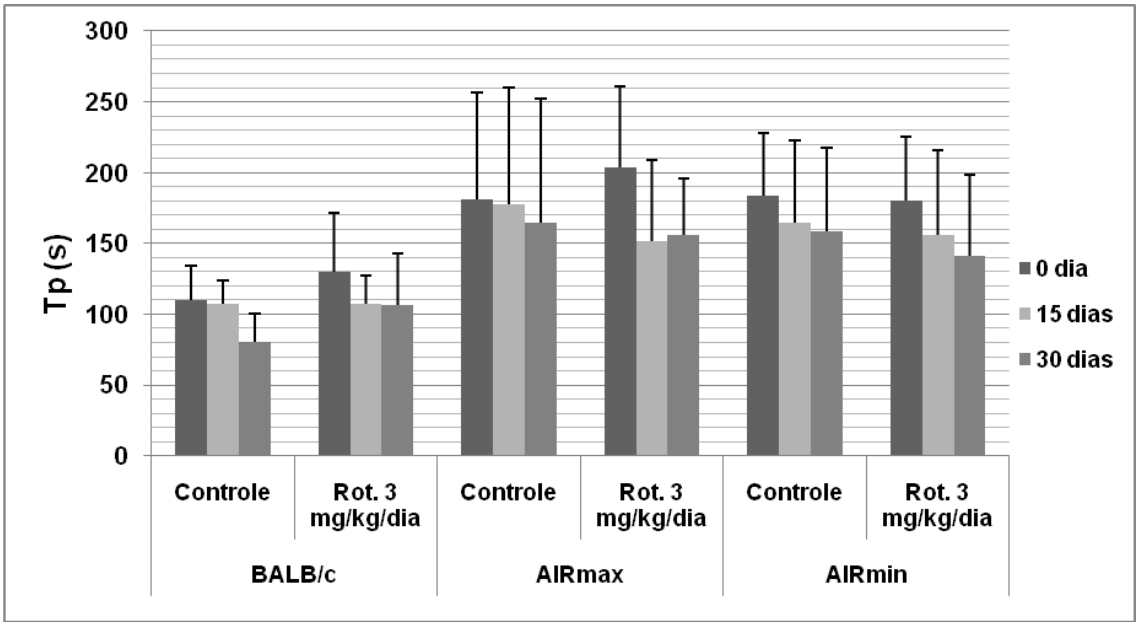

Gráfico 9: Testes efetuados no Rotarod em paradigma de avaliação de 5 à 50 rpm durante 5 minutos, empregando camundongos adultos (6 meses) das linhagens BALB/c, AIRmax e AIRmin antes e após tratamento com a Rotenona (3 mg/kg/dia i.p.). Foram avaliadas as média dos melhores tempos de persistência por grupo (Tp) antes (0 dia), 15, 30 e 45 dias após o tratamento. BALB/c (Cont. *n*=10; Trat. *n*=13); AIRmax (Cont. *n*=8; Trat. *n*=9); AIRmin (Cont. *n*=8; Trat. *n*=7). Não foi detectada diferença significante entre animais tratados ou não tratados com Rotenona (3 mg/kg/dia i.p.), independente da linhagem (p=0.212), mas houve diferença significante na performace no Rotarod entre BALB/c e AIRmax e entre BALB/c e AIRmin (Bonferroni, p<0,001) independente do tratamento. Barra representa o desvio padrão.

Os resultados do teste comportamental, bem como a análise estatística dos dados, não demonstraram perda de coordenação motora durante o tratamento. A análise histológica não demonstrou perda de corpos celulares nas regiões da SNc e estriado nas lâminas em codições de serem examinadas.

Os modelos animais para estudos da DP podem proporcionar um elo crítico para estabelecer o papel causal das neurotoxinas como pesticidas e herbicidas na etiologia da doença, além de permitir estudos que são inviáveis em pacientes humanos. No entanto são limitados por suas incapacidades de reproduzir todas as características da doença (86). Acredita-se que na DP o processo neurodegenerativo ocorra ao longo de vários anos, enquanto que o tratamento por neurotoxinas gera lesão em apenas alguns dias (192). As rotas e tempo de exposição às drogas na grande maioria dos modelos não mimetizam o que realmente ocorre na condição humana, e as diferenças anatômicas e bioquímicas entre as espécies podem afetar a resposta, mesmo em doses equivalentes. São

vários os modelos animais empregados em estudos da DP, cada qual com suas próprias vantagens e desvantagens, mas o modelo ideal que recapitula todas as características clínicas e patológicas relevantes da doença, tanto no sistema nervoso quanto no periférico, ainda não existe. Apesar dessas limitações os modelos animais para DP induzidos por neurotoxinas, vem sendo amplamente utilizados, continuam a evoluir e tem fornecido uma gama de conhecimentos no que diz respeito a doença e os prováveis alvos farmacológicos na tentativa de prevenir, estabilizar e melhorar o quadro clínico (193), auxiliando no conhecimento dos eventos que podem estar envolvidos na DP idiopática e hereditária.

4.3 Linhagens AIRmax e AIRmin

As linhagens de camundongos AIRmax e AIRmin foram empregados para estudar o impacto do controle genético da resposta inflamatória na suceptibilidade para doenças autoimunes (178), neoplásicas (174) e infecciosas (176). A resposta inflamatória aguda ao biogel, bem como susceptibilidade a artrite induzida por pristane, a fatores químicos indutores de tumor, antígenos para *Salmonella enterica* e lipopolisacarídeos de bactérias, foram todas investigadas nestes camundongos (173). Embora indivídous AIRmax e AIRmin sejam geneticamente heterogêneos, estes são homozigotos a vários *locus* de característica quantitativas específicas para resposta inflamatória aguda, conferindo-lhes divergência fenotípicas opostas (173, 194). Alguns estudos tem demonstrado divergências na liberação e expressão de mediadores inflamatórios entre as linhagens quando desafiadas a diferentes estímulos. Camundongos AIRmax apresentam maior produção de citocinas como a IL-6 (*in vivo*) e IL-1β (*ex vivo*) quando desafiados ao biogel e lipopolissacarídeos de bactérias acompanhado por ATP, respectivamente (194, 195). A administração i.p. do veneno bruto da serpente *Bothops jararaca,* levou a maior produção de TNF-α e IFN-γ, além de ON e PGE2 nos AIRmax, quando comparada aos AIRmin (196). Além disso, estudos *in vitro* comparando a produção de mediadores pró-inflamatórios em células esplênicas após incubação com indutores específicos, demonstraram a produção de altos níveis de TNF-α e IFN-γ por células de animais AIRmax, mas não dos AIRmin (197). Como já citado, os mediadores inflamatórios TNF-α, IFN-γ, IL-1β e IL-6 são encontrados em altos níveis no cérebro e fluído cerebroespinal de pacientes parkinsonianos e contribuem para o estresse oxidativo

e a neurodegeneração (121, 140). Estudos empregando modelos animais tratados por MPTP demonstraram que camundongos desprovidos de receptores para TNF-α (198), bem como camundongos *knock-out* de genes responsáveis pela produção de IFN-γ ou de seus receptores, são resistentes a neurotoxina (144). Todos os estudos empregando as linhagens AIRmax e AIRmin, desafiam as suas sensibilidades e resistências, avaliando respostas inflamatórias periféricas, como infiltração celular, extravasamento protéico no tecido, além dos ensaios *in vitro* e *ex vivo* com células ou tecidos isolados, mas quanto às diferenças inflamatórias no SNC, praticamente nada foi estudado. De acordo com os resultados obtidos aquí não se observaram diferenças significativas na susceptibilidade de ambas as linhagens aos tratamento pelo MPTP e rotenona.

Tendo em vista que o TNF-α, IFN-γ e IL-1β estão envolvidos na neurodegeneração da DP e que os AIRmax tendem a produzir maiores taxas destes mediadores quando desafiados perifericamente, sugerimos que os mecanismos regulatórios selecionados para resposta inflamatória inata periférica nas linhagens, podem não corresponder aos mesmos envolvidos na resposta inflamatória inata no SNC.

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo permitem concluir que:

- Nenhuma das linhagens apresentou prejuízo motor significativo quando avaliados no Rotarod tanto nos tratamentos por MPTP quanto por rotenona.
- Até onde foi possível observar, o tratamento agudo de 4 e 5 doses de 20 mg/kg em um único dia por MPTP não causou lesão na SNc e estriado em nenhuma linhagens.
- Considerando o desempenho comportamental, a população de camundongos C57BL/6 empregada neste estudo apresentou resistência ao MPTP.
- Os problemas na administração de rotenona com as mini-bombas Alzet não permitiram definir com segurança o grau de susceptibilidade das diversas linhagens aos tratamentos crônicos de 6 e 12 mg/kg/dia.
- As linhagens AIRmax e AIRmin dificilmente representam potenciais modelos animais para a DP.

REFERÊNCIAS[*]

1. Kapp W. The history of drugs for the treatment of Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl. 1992;38:1-6.

2. Meissner WG, Frasier M, Gasser T, Goetz CG, Lozano A, Piccini P, et al. Priorities in Parkinson's disease research. Nat Rev Drug Discov. 2011;10(5):377-93.

3. Farrer MJ. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. Nat Rev Genet. 2006;7(4):306-18.

4. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron. 2003;39(6):889-909.

5. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? Lancet Neurol. 2009;8(4):382-97.

6. Tansey MG, Frank-Cannon TC, McCoy MK, Lee JK, Martinez TN, McAlpine FE, et al. Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? Front Biosci. 2008;13:709-17.

7. Chertoff M, Di Paolo N, Schoeneberg A, Depino A, Ferrari C, Wurst W, et al. Neuroprotective and neurodegenerative effects of the chronic expression of tumor necrosis factor alpha in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice. Exp neurol. 2011;227(2):237-51.

8. Nagatsu T, Sawada M. Cellular and molecular mechanisms of Parkinson's disease: neurotoxins, causative genes, and inflammatory cytokines. Cell Mol Neurobiol. 2006;26(4-6):781-802.

9. Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. Lancet Neurol. 2006;5(3):235-45.

10. Ziemssen T, Reichmann H. Non-motor dysfunction in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2007;13(6):323-32.

11. Shulman LM, Taback RL, Bean J, Weiner WJ. Comorbidity of the nonmotor symptoms of Parkinson's disease. Mov Disord. 2001;16(3):507-10.

12. Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. Prog Neurobiol. 2000;62(1):63-88.

[*] De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

13. Nambu A. A new approach to understand the pathophysiology of Parkinson's disease. J Neurol. 2005;252(Suppl 4):IV1-IV4.

14. Bartels AL, Leenders KL. Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. Cortex. 2009;45(8):915-21.

15. Jaidar O, Carrillo-Reid L, Hernandez A, Drucker-Colin R, Bargas J, Hernandez-Cruz A. Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. J Neurosci. 2010;30(34):11326-36.

16. Pakkenberg B, Moller A, Gundersen HJ, Mouritzen Dam A, Pakkenberg H. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1991;54(1):30-3.

17. Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1988;51(6):745-52.

18. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging. 2003;24(2):197-211.

19. Halliday GM, McCann H. The progression of pathology in Parkinson's disease. Ann N Y Acad Sci. 2010;1184:188-95.

20. Bandopadhyay R, de Belleroche J. Pathogenesis of Parkinson's disease: emerging role of molecular chaperones. Trends Mol Med. 2010;16(1):27-36.

21. Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. Neuron. 2001;29(1):15-32.

22. Wilkinson KD. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. Semin Cell Dev Biol. 2000;11(3):141-8.

23. Jain S, Wood NW, Healy DG. Molecular genetic pathways in Parkinson's disease: a review. Clin Sci. 2005;109(4):355-64.

24. Sidhu A, Wersinger C, Vernier P. Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? FASEB J. 2004;18(6):637-47.

25. Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. J Neurosci. 2002;22(8):3090-9.

26. Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, et al. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. J Neurosci. 2002;22(20):8797-807.

27. Wersinger C, Sidhu A. Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. Neurosci Lett. 2003;340(3):189-92.

28. Volles MJ, Lansbury PT, Jr. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. Biochemistry. 2002;41(14):4595-602.

29. Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, et al. Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. J Mol Biol. 2002;322(5):1089-102.

30. Chinta SJ, Andersen JK. Redox imbalance in Parkinson's disease. Biochim Biophys Acta. 2008;1780(11):1362-7.

31. Miller RL, James-Kracke M, Sun GY, Sun AY. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. Neurochem Res. 2009;34(1):55-65.

32. Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem J. 1980 1;191(2):421-7.

33. Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. Arch Biochem Biophys. 1985;237(2):408-14.

34. Norris EH, Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VM. Effects of oxidative and nitrative challenges on alpha-synuclein fibrillogenesis involve distinct mechanisms of protein modifications. J Biol Chem. 2003;278(29):27230-40.

35. Martin HL, Teismann P. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. FASEB J. 2009;23(10):3263-72.

36. Kuhn DM, Lovenberg W. Inactivation of tyrosine hydroxylase by reduced pterins. Biochem Biophys Res Commun. 1983;117(3):894-900.

37. Liu Y, Peter D, Roghani A, Schuldiner S, Prive GG, Eisenberg D, et al. A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. Cell. 1992;70(4):539-51.

38. Berry MD, Juorio AV, Paterson IA. The functional role of monoamine oxidases A and B in the mammalian central nervous system. Progress in neurobiology. 1994;42(3):375-91.

39. Gluck MR, Zeevalk GD. Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine and its metabolites: implications for Parkinson's disease and catecholamine-associated diseases. J Neurochem. 2004;91(4):788-95.

40. Maker HS, Weiss C, Silides DJ, Cohen G. Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. J Neurochem. 1981;36(2):589-93.

41. Youdim MB. What have we learnt from CDNA microarray gene expression studies about the role of iron in MPTP induced neurodegeneration and Parkinson's disease? J Neural Transm Suppl. 2003(65):73-88.

42. Jellinger KA. The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. Drugs Aging. 1999;14(2):115-40.

43. Graham DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. Mol Pharmacol. 1978;14(4):633-43.

44. Weihe E, Eiden LE. Chemical neuroanatomy of the vesicular amine transporters. FASEB J. 2000;14(15):2435-49.

45. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. Annu Rev Biochem. 2004;73:87-106.

46. Szabadkai G, Duchen MR. Mitochondria: the hub of cellular Ca2+ signaling. Physiology (Bethesda). 2008;23:84-94.

47. Keane PC, Kurzawa M, Blain PG, Morris CM. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Parkinsons Dis. 2011;2011:716871.

48. Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. Cell. 2006;125(7):1241-52.

49. Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem J. 1980;191(2):421-7.

50. Takeshige K, Minakami S. NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH-ubiquinone reductase preparation. Biochem J. 1979;180(1):129-35.

51. Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. Arch of Biochem Biophys. 1985;237(2):408-14.

52. Beyer RE. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. Biochem Cell Biol. 1992;70(6):390-403.

53. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. Cell Tissue Res. 2004;318(1):215-24.

54. Ravanel P, Tissut M, Douce R. Effects of rotenoids on isolated plant mitochondria. Plant Physiol. 1984;75(2):414-20.

55. Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. N Engl J Med. 1998 ;339(15):1044-53.

56. Lin TK, Liou CW, Chen SD, Chuang YC, Tiao MM, Wang PW, et al. Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. Chang Gung Med J. 2009;32(6):589-99.

57. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. Nature. 2000;407(6805):802-9.

58. Perier C, Tieu K, Guegan C, Caspersen C, Jackson-Lewis V, Carelli V, et al. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(52):19126-31.

59. Perier C, Bove J, Wu DC, Dehay B, Choi DK, Jackson-Lewis V, et al. Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(19):8161-6.

60. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochem Pharmacol. 2002;64(5-6):1019-26.

61. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Cell Signal. 2007;19(9):1807-19.

62. Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. Nat Rev Neurosci. 2001;2(5):325-34.

63. Glinka Y, Tipton KF, Youdim MB. Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. Eur J Pharmacol. 1998;351(1):121-9.

64. Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV. Complex I and Parkinson's disease. IUBMB Life. 2001;52(3-5):135-41.

65. Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. Neurosci Lett. 1992;142(2):128-30.

66. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. Ann Neurol. 1994;36(3):348-55.

67. Hastings TG, Lewis DA, Zigmond MJ. Reactive dopamine metabolites and neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. Adv Exp Med Biol. 1996;387:97-106.

68. Uversky VN. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. Cell Tissue Res. 2004;318(1):225-41.

69. Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal

dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? Brain Res. 2000;873(2):225-34.

70. Schiff SJ. Towards model-based control of Parkinson's disease. Philos Transact A Math Phys Eng Sci. 2010;368(1918):2269-308.

71. Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonsim and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. Adv Neurol. 1993;60:600-8.

72. Meredith GE, Totterdell S, Potashkin JA, Surmeier DJ. Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. Parkinsonism Relat Disord. 2008;14(Suppl 2):S112-5.

73. Furuya T, Hayakawa H, Yamada M, Yoshimi K, Hisahara S, Miura M, et al. Caspase-11 mediates inflammatory dopaminergic cell death in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. J Neurosci. 2004;24(8):1865-72.

74. Kurkowska-Jastrzebska I, Wronska A, Kohutnicka M, Czlonkowski A, Czlonkowska A. MHC class II positive microglia and lymphocytic infiltration are present in the substantia nigra and striatum in mouse model of Parkinson's disease. Acta Neurobiol Exp (Wars). 1999;59(1):1-8.

75. Sugama S, Yang L, Cho BP, DeGiorgio LA, Lorenzl S, Albers DS, et al. Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. Brain Res. 2003;964(2):288-94.

76. Ohashi S, Mori A, Kurihara N, Mitsumoto Y, Nakai M. Age-related severity of dopaminergic neurodegeneration to MPTP neurotoxicity causes motor dysfunction in C57BL/6 mice. Neurosci Lett. 2006;401(1-2):183-7.

77. Muthane U, Ramsay KA, Jiang H, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Fernando S, et al. Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice. Exp Neurol. 1994;126(2):195-204.

78. Suzuki K, Mizuno Y, Yoshida M. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-like compounds on mitochondrial respiration. Adv neurol. 1990;53:215-8.

79. Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. Life Sci. 1985;36(26):2503-8.

80. Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. NeuroRx. 2005;2(3):484-94.

81. Heikkila RE, Nicklas WJ, Vyas I, Duvoisin RC. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. Neurosci Lett. 1985;62(3):389-94.

82. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. Nat Neurosci. 2000;3(12):1301-6.

83. Schmidt WJ, Alam M. Controversies on new animal models of Parkinson's disease pro and con: the rotenone model of Parkinson's disease (PD). J Neural Transm Suppl. 2006(70):273-6.

84. Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. J Neurosci. 2003;23(34):10756-64.

85. Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, Mastroberardino PG. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. Trends Pharmacol Sci. 2010;31(4):141-2.

86. Cicchetti F, Drouin-Ouellet J, Gross RE. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? Trends Pharmacol Sci. 2009;30(9):475-83.

87. Drechsel DA, Patel M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. Free Radic Biol Med. 2008;44(11):1873-86.

88. Hirsch EC, Hunot S, Hartmann A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2005;11(Suppl 1):S9-S15.

89. Herrera AJ, Tomas-Camardiel M, Venero JL, Cano J, Machado A. Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons. J Neural Transm. 2005;112(1):111-9.

90. Lee Mosley R, Benner EJ, Kadiu I, Thomas M, Boska MD, Hasan K, et al. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. Clin Neurosc Res. 2006;6(5):261-81.

91. Cross AK, Woodroofe MN. Immunoregulation of microglial functional properties. Microsc ResTech. 2001;54(1):10-7.

92. Purisai MG, McCormack AL, Cumine S, Li J, Isla MZ, Di Monte DA. Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. Neurobiol dis. 2007;25(2):392-400.

93. Sanchez-Guajardo V, Febbraro F, Kirik D, Romero-Ramos M. Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease. PLoS One. 2010;5(1):e8784.

94. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Cytokines in Parkinson's disease. JNeural Transm Suppl. 2000(58):143-51.

95. Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, et al. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. Neuroscience. 1996 May;72(2):355-63.

96. Stone DK, Reynolds AD, Mosley RL, Gendelman HE. Innate and adaptive immunity for the pathobiology of Parkinson's disease. Antioxid Redox signal. 2009;11(9):2151-66.

97. Cruvinel Wde M, Mesquita D, Jr., Araujo JA, Catelan TT, de Souza AW, da Silva NP, et al. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. Rev Bras Reumatol. 2010;50(4):434-61.

98. Griffiths M, Neal JW, Gasque P. Innate immunity and protective neuroinflammation: new emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. Int Rev Neurobiol. 2007;82:29-55.

99. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by *Toll-like* receptors. Trends Mol Med. 2007;13(11):460-9.

100. Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, Li R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. Glia. 2002 Nov;40(2):260-9.

101. Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, et al. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. FASEB J. 2005;19(6):533-42.

102. Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. Immunology. 2010;129(2):154-69.

103. Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. Glia. 2010;58(3):253-63.

104. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. J Allergy Clin Immunol. 2006;117(5):979-87.

105. Sabroe I, Whyte MK. Toll-like receptor (TLR)-based networks regulate neutrophilic inflammation in respiratory disease. Biochem Soc Trans. 2007;35(Pt 6):1492-5.

106. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. J Immunol. 2004;173(6):3916-24.

107. Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. Glia. 2003;43(3):281-91.

108. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. J Neuropathol Exp Neurol. 2002;61(11):1013-21.

109. Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, et al. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(34):13798-803.

110. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. Ann NY Acad Sci. 2008;1143:1-20.

111. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol. 2003;21:335-76.

112. Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. J Immunol. 2005;175(7):4320-30.

113. Mishra BB, Mishra PK, Teale JM. Expression and distribution of Toll-like receptors in the brain during murine neurocysticercosis. J Neuroimmunol. 2006;181(1-2):46-56.

114. Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, Elhofy A, Karpus WJ, Miller SD. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. Glia. 2005;49(3):360-74.

115. Chan A, Seguin R, Magnus T, Papadimitriou C, Toyka KV, Antel JP, et al. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. Glia. 2003;43(3):231-42.

116. Williams K, Dooley N, Ulvestad E, Becher B, Antel JP. IL-10 production by adult human derived microglial cells. Neurochem Int. 1996;29(1):55-64.

117. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature. 200;413(6857):732-8.

118. Letiembre M, Liu Y, Walter S, Hao W, Pfander T, Wrede A, et al. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. Neurobiol Aging. 2009;30(5):759-68.

119. Panaro MA, Lofrumento DD, Saponaro C, De Nuccio F, Cianciulli A, Mitolo V, et al. Expression of TLR4 and CD14 in the central nervous system (CNS) in a MPTP mouse model of Parkinson's-like disease. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2008;30(4):729-40.

120. Nolan Y, Vereker E, Lynch AM, Lynch MA. Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus. Exp Neurol. 2003;184(2):794-804.

121. Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. Exp Neurol. 2007;208(1):1-25.

122. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annu Rev Immunol. 2009;27:119-45.

123. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. Neurosci. 1990;39(1):151-70.

124. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci. 1996;19(8):312-8.

125. Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. J Neuroimmunol. 2009;210(1-2):3-12.

126. Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. Trends Immunol. 2008;29(8):357-65.

127. Wu DC, Teismann P, Tieu K, Vila M, Jackson-Lewis V, Ischiropoulos H, et al. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(10):6145-50.

128. Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, et al. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. FASEB J. 2005;19(6):533-42.

129. Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. Neurobiol Aging. 2008;29(11):1690-701.

130. Reynolds AD, Glanzer JG, Kadiu I, Ricardo-Dukelow M, Chaudhuri A, Ciborowski P, et al. Nitrated alpha-synuclein-activated microglial profiling for Parkinson's disease. J Neurochem. 2008;104(6):1504-25.

131. Croisier E, Moran LB, Dexter DT, Pearce RK, Graeber MB. Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. J Neuroinflammation. 2005;2:14.

132. Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. Trends Pharmacol Sci. 2003;24(8):395-401.

133. Barcia C, Sanchez Bahillo A, Fernandez-Villalba E, Bautista V, Poza YPM, Fernandez-Barreiro A, et al. Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. Glia. 2004;46(4):402-9.

134. Gao HM, Hong JS, Zhang W, Liu B. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. J Neurosci. 2002;22(3):782-90.

135. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol. 2003;73(2):209-12.

136. Appel SH, Beers DR, Henkel JS. T cell-microglial dialogue in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening? Trends Immunol. 2010;31(1):7-17.

137. Stone DK, Reynolds AD, Mosley RL, Gendelman HE. Innate and adaptive immunity for the pathobiology of Parkinson's disease. Antioxid Redox Signal. 2009;11(9):2151-66.

138. Suzumura A, Sawada M, Takayanagi T. Production of interleukin-12 and expression of its receptors by murine microglia. Brain Research. 1998;787(1):139-42.

139. Kamm K, Vanderkolk W, Lawrence C, Jonker M, Davis AT. The effect of traumatic brain injury upon the concentration and expression of interleukin-1beta and interleukin-10 in the rat. J Trauma. 2006;60(1):152-7.

140. Brodacki B, Staszewski J, Toczylowska B, Kozlowska E, Drela N, Chalimoniuk M, et al. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. Neurosci Lett. 2008;441(2):158-62.

141. Kawanokuchi J, Mizuno T, Takeuchi H, Kato H, Wang J, Mitsuma N, et al. Production of interferon-gamma by microglia. Mult Scler. 2006;12(5):558-64.

142. Okuno T, Nakatsuji Y, Kumanogoh A, Moriya M, Ichinose H, Sumi H, et al. Loss of dopaminergic neurons by the induction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via CD 40: relevance to Parkinson's disease. J Neurosci Res. 2005;81(6):874-82.

143. Mizuta I, Nishimura M, Mizuta E, Yamasaki S, Ohta M, Kuno S, et al. Relation between the high production related allele of the interferon-gamma (IFN-gamma) gene and age at onset of idiopathic Parkinson's disease in Japan. J neurol neurosurg psychiatry. 2001;71(6):818-9.

144. Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, Slack R, et al. Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. The Journal of neuroscience : J Neurosci. 2007;27(12):3328-37.

145. Litteljohn D, Mangano E, Shukla N, Hayley S. Interferon-gamma deficiency modifies the motor and co-morbid behavioral pathology and neurochemical changes provoked by the pesticide paraquat. Neuroscience. 2009;164(4):1894-906.

146. Ciesielska A, Joniec I, Przybylkowski A, Gromadzka G, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowska A, et al. Dynamics of expression of the mRNA for cytokines and inducible nitric synthase in a murine model of the Parkinson's disease. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2003;63(2):117-26.

147. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Feb;87(4):1620-4.

148. Dawson TM, Zhang J, Dawson VL, Snyder SH. Nitric oxide: cellular regulation and neuronal injury. Prog Brain Res. 1994;103:365-9.

149. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, et al. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. Am J Physiol. 1997;273(1 Pt 1):G7-17.

150. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell. 2001;104(4):487-501.

151. Zhao Y, Li S, Childs EE, Kuharsky DK, Yin XM. Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor-alpha-induced liver injury. J Biol Chem. 2001;276(29):27432-40.

152. Shen HM, Pervaiz S. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. FASEB J. 2006;20(10):1589-98.

153. Rousselet E, Callebert J, Parain K, Joubert C, Hunot S, Hartmann A, et al. Role of TNF-alpha receptors in mice intoxicated with the parkinsonian toxin MPTP. Exp Neurology. 2002;177(1):183-92.

154. Ferger B, Leng A, Mura A, Hengerer B, Feldon J. Genetic ablation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. J Neurochem. 2004;89(4):822-33.

155. Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. FASEB J. 2002;16(11):1474-6.

156. Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-alpha. The FASEB J. 2006;20(6):670-82.

157. Ferrari CC, Pott Godoy MC, Tarelli R, Chertoff M, Depino AM, Pitossi FJ. Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. Neurobiol Dis. 2006;24(1):183-93.

158. Hebert G, Arsaut J, Dantzer R, Demotes-Mainard J. Time-course of the expression of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in the striatum and mesencephalon of mice injected with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, a dopaminergic neurotoxin. Neurosci Lett. 2003;349(3):191-5.

159. Bian MJ, Li LM, Yu M, Fei J, Huang F. Elevated interleukin-1beta induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine aggravating dopaminergic neurodegeneration in old male mice. Brain Res. 2009;1302:256-64.

160. Griffin WS, Liu L, Li Y, Mrak RE, Barger SW. Interleukin-1 mediates Alzheimer and Lewy body pathologies. J Neuroinflammation. 2006;3:5.

161. Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. Brain Res. 1992;587(2):250-6.

162. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1998;38:97-120.

163. Sanchez-Pernaute R, Ferree A, Cooper O, Yu M, Brownell AL, Isacson O. Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. J Neuroinflammation. 2004;1(1):6.

164. Zhang L, Dawson VL, Dawson TM. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. Pharmacol Ther. 2006;109(1-2):33-41.

165. Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, et al. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. Nat Med. 1999;5(12):1403-9.

166. Town T, Nikolic V, Tan J. The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. J Neuroinflammation. 2005;2:24.

167.Monahan AJ, Warren M, Carvey PM. Neuroinflammation and peripheral immune infiltration in Parkinson's disease: an autoimmune hypothesis. Cell Transplant. 2008;17(4):363-72.

168. McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. Ann Neurol. 1988;24(4):574-6.

169. Brochard V, Combadiere B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthat V, et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. J Clin Invest. 2009;119(1):182-92.

170. Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology. Acta Neuropathol. 2010;119(1):89-105.

171. Stiffel C, Ibanez OM, Ribeiro OG, Decreusefond C, Mouton D, Siqueira M, et al. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. Exp Clin Immunogenet. 1990;7(4):221-33.

172. Ibanez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, De Franco M, et al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. Eur J Immunol. 1992;22(10):2555-63.

173. Carneiro Pdos S, Peters LC, Vorraro F, Borrego A, Ribeiro OG, Starobinas N, et al. Gene expression profiles of bone marrow cells from mice phenotype-selected for maximal or minimal acute inflammations: searching for genes in acute inflammation modifier loci. Immunology. 2009;128(1 Suppl):e562-71.

174. Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A, Araujo ML, Maria DA, De Franco M, et al. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. Carcinogenesis. 1998;19(2):337-46.

175. Amano MT, Carneiro AS, Ribeiro OG, Cabrera WK, De Franco M, Ibanez OM, et al. A new model of outbred genetically selected mice which present a strong acute inflammatory response in the absence of complement component C5. Inflamm Res. 2009;58(4):204-9.

176. Araujo LM, Ribeiro OG, Siqueira M, De Franco M, Starobinas N, Massa S, et al. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. Eur J Immunol. 1998;28(9):2913-20.

177. Maria DA, Ribeiro OG, Pizzocaro KF, De Franco M, Cabrera WK, Starobinas N, et al. Resistance to melanoma metastases in mice selected for high acute inflammatory response. Carcinogenesis. 2001;22(2):337-42.

178. Vigar ND, Cabrera WH, Araujo LM, Ribeiro OG, Ogata TR, Siqueira M, et al. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. Eur J Immunol. 2000;30(2):431-7.

179. Anderson DW, Bradbury KA, Schneider JS. Neuroprotection in Parkinson models varies with toxin administration protocol. Eur J Neurosci. 2006;24(11):3174-82.

180. Tanaka M, Suemaru K, Watanabe S, Cui R, Li B, Araki H. Comparison of short- and long-acting benzodiazepine-receptor agonists with different receptor selectivity on motor coordination and muscle relaxation following thiopental-induced anesthesia in mice. J Pharmacol Sci. 2008;107(3):277-84.

181. Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. Motor coordination and balance in rodearch. Nat Rev Drug Discov. 2011;10(5):377-93.

182. Hamre K, Tharp R, Poon K, Xiong X, Smeyne RJ. Differential strain susceptibility following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)

administration acts in an autosomal dominant fashion: quantitative analysis in seven strains of Mus musculus. Brain Res. 1999;828(1-2):91-103.

183. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R, et al. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. J Neurochem. 2001;76(5):1265-74.

184. Sundstrom E, Samuelsson EB. Comparison of key steps in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in rodents. Pharmacol Toxicol. 1997;81(5):226-31.

185. Giovanni A, Sieber BA, Heikkila RE, Sonsalla PK. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: Systemic administration. J Pharmacol Exp Ther. 1994;270(3):1000-7.

186. Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RK. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. Behav Genet. 2000;30(3):171-82.

187. Sonsalla PK, Heikkila RE. The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. Eur J Pharmacol. 1986;129(3):339-45.

188. Heikkila RE. Differential neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in Swiss-Webster mice from different sources. Eur J Pharmacol. 1985;117(1):131-3.

189. Fleming SM, Zhu C, Fernagut PO, Mehta A, DiCarlo CD, Seaman RL, et al. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. Exp Neurol. 2004;187(2):418-29.

190. Richter F, Hamann M, Richter A. Chronic rotenone treatment induces behavioral effects but no pathological signs of parkinsonism in mice. J Neurosci Res. 2007;85(3):681-91.

191. Corona JC, Gimenez-Cassina A, Lim F, Diaz-Nido J. Hexokinase II gene transfer protects against neurodegeneration in the rotenone and MPTP mouse models of Parkinson's disease. J Neurosci Res. 2010;88(9):1943-50.

192. Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Neurodegeneration. 1995;4(3):257-69.

193. Martinez TN, Greenamyre JT. Toxin Models of Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. Antiox Redox Signal. 2011 Jul 12. In press.

194. Vorraro F, Galvan A, Cabrera WH, Carneiro PS, Ribeiro OG, De Franco M, et al. Genetic control of IL-1 beta production and inflammatory response by the mouse Irm1 locus. J Immunol. 2010;185(3):1616-21.

195. Ribeiro OG, Maria DA, Adriouch S, Pechberty S, Cabrera WH, Morisset J, et al. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. J Leukoc Biol. 2003;74(4):497-506.

196. Carneiro AS, Ribeiro OG, De Franco M, Cabrera WH, Vorraro F, Siqueira M, et al. Local inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca venom differs in mice selected for acute inflammatory response. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 2002;40(11):1571-9.

197. Castoldi L, Golim MA, Filho OG, Romagnoli GG, Ibanez OC, Kaneno R. Enhanced natural killer activity and production of pro-inflammatory cytokines in mice selected for high acute inflammatory response (AIRmax). Immunology. 2007;120(3):372-9.

198. Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-alpha. FASEB J. 2006;20(6):670-82.